ZUR KENNTNIS DER URSACHEN FEHLERHAFTER TEILCHENGRÖSSEN-WIEDERGABE DURCH DEN COULTER COUNTER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gerhard Raisig

aus Nürnberg

Würzburg 1970

ZUR KENNTNIS DER URSACHEN FEHLERHAFTER TEILCHENGRÖSSEN-WIEDERGABE DURCH DEN COULTER COUNTER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Gerhard Raisig

aus Nürnberg

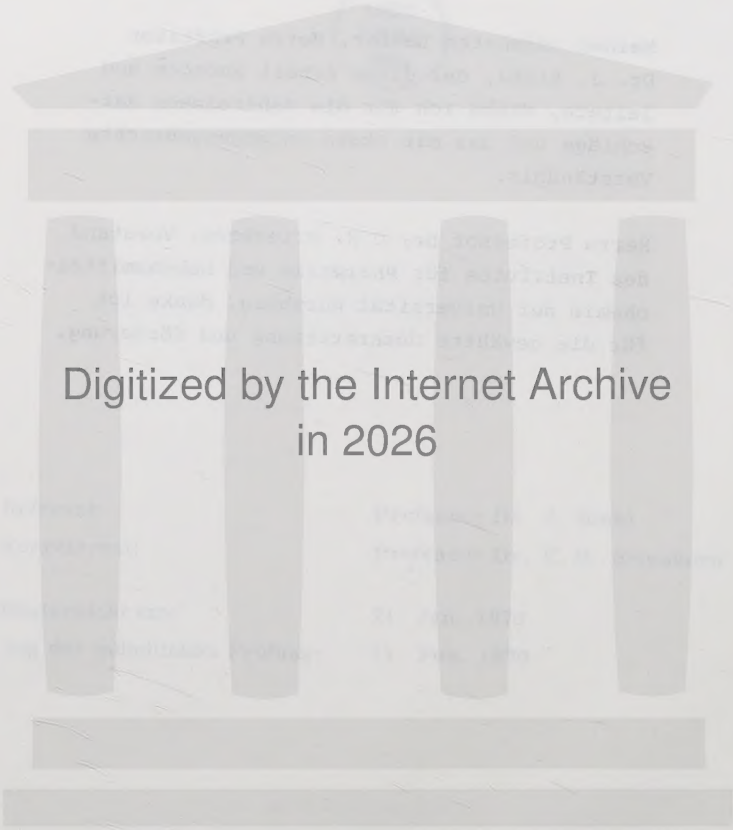
Würzburg 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent:	Professor Dr. J. Riehl
Korreferent:	Professor Dr. C. H. Brieskorn
Eingereicht am:	21. Jan. 1970
Tag der mündlichen Prüfung:	11. Feb. 1970

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. J. Riehl, der diese Arbeit anregte und leitete, danke ich für die zahlreichen Ratschläge und das mir stets entgegengebrachte Verständnis.

Herrn Professor Dr. C.H. Brieskorn, Vorstand des Institutes für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, danke ich für die gewährte Unterstützung und Förderung.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0013

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung 1
2. Funktion und Aufbau des Coulter Counters 4
   2.1 Beschreibung des Meßprinzips und des Gerätes 4
   2.2 Ermittlung des Teilchenvolumens 7
   2.3 Beziehung zwischen Widerstandsänderung und Teilchenvolumen 9
3. Eichung des Coulter Counters 12
   3.1 Gebräuchliche Eichmethoden 12
   3.2 Ergebnisse der Eichung des Coulter Counters für Kapillaren verschiedener Bohrungsdurchmesser 15
4. Prüfungen des Gerätes zur Ermittlung der Ursache unterschiedlicher Verteilungswiedergabe mit Kapillaren verschiedenen Bohrungsdurchmessers 18
   4.1 Untersuchungen am elektrischen Teil des Coulter Counters 18
      4.1.1 Stromstärken in Abhängigkeit von m_i 18
      4.1.2 Spannungskonstanz während der Meßzeit 19
      4.1.3 Lineare Abhängigkeit der Diskriminatorspannung U_D vom Schwellwert t' 20
      4.1.4 Überprüfung der Verstärkungsfaktoren m_V und MSw 20
      4.1.5 Überprüfung der Gain Trim-Verstärkungsregelung 23
   4.2 Abhängigkeit des Eichfaktors von der Eichsubstanz 24
   4.3 Prüfung der Beziehung zwischen K_V und dem Bohrungsdurchmesser der Kapillaren 26

Seite

4.4 Bestimmung des Eichfaktors bei gleicher durchschnittlicher Impulsfolgefrequenz 29
4.5 Abhängigkeit des Eichfaktors von der Strömungsgeschwindigkeit der Teilchensuspension 31
4.6 Einfluß der Elektrolytleitfähigkeit auf den Eichfaktor 33
5. Untersuchung der Koinzidenzerscheinungen 35
5.1 Begriff der Koinzidenz 35
5.2 Charakterisierung der Auswirkung von Koinzidenz- und anderen Einflüssen auf das Meßergebnis 36
5.3 Übersicht der bisherigen Behandlung des Problems der Kurvenverfälschung in der Literatur 38
5.4 Die Koinzidenzkorrektur nach EDMUNDSON Prinzip und Ergebnisse der Anwendung 42
5.5 Der Aussagewert der Extrapolationsmethode nach EDMUNDSON 46
5.6 Erklärung des McGEE-Effektes durch das Vorkommen von Überlagerungsimpulsen 49
5.7 Oszillographische Untersuchung der Impulse 53
5.7.1 Messung der Impulsdauer 57
5.7.2 Überlagerungsimpulse 61
5.8 Die Entstehung zu kleiner Impulse bei Bohrungen verschiedenen Durchmessers 62
6. Auswirkungen des Auftretens zu kleiner Impulse 69
6.1 Die Wiedergabe breiter Verteilungen mit Kapillaren verschiedener Bohrungsdurchmesser 69
6.2 Die Anwendbarkeit der Volumen-Eichmethode 71
6.3 Gültigkeit von Verteilungsextrapolationen 74
7. Diskussion der Ergebnisse 76

B. Z U S A M M E N F A S S U N G 82

Seite

C. EXPERIMENTELLER TEIL 85

1. Ausrüstung zur Teilchengrößenbestimmung mit dem Coulter Counter 85
2. Elektrische Messungen am Coulter Counter 87
3. Messung der Elektrolytleitfähigkeit 88
4. Aufnahme des Strömungsverlaufes in den Kapillaren 88
5. Eichsubstanzen 88
6. Ausrüstung zur mikroskopischen Teilchengrößenbestimmung 94
7. Bereitung der Teilchensuspension zur Messung mit dem Coulter Counter 95
8. Hinweise zur Arbeit mit dem Coulter Counter 96

D. ANHANG 98

Übersicht der bisherigen Verwendung des Coulter Counters in der pharmazeutischen Technologie

E. ALPHABETISCHES LITERATURVERZEICHNIS 100

A. ALLGEMEINER TEIL

1. EINLEITUNG

Die Verwendung fester, ungelöster Arzneistoffe in der Therapie bringt insofern Probleme mit sich, als in der Regel nur gelöste Stoffe resorbiert werden. Zwischen der Applikation und der Resorption der Arzneistoffe liegt der Lösungsvorgang, dessen Geschwindigkeit mit über die Arzneistoffwirkung entscheidet. Die Lösungsgeschwindigkeit einer Substanz wird im wesentlichen bestimmt von ihrer Löslichkeit und spezifischen Oberfläche. Durch Verkleinern der Teilchengröße eines Arzneistoffes wird seine Oberfläche vergrößert und damit indirekt über die Lösungsgeschwindigkeit seine Wirksamkeit verbessert. Probleme bei der Arzneiformenherstellung entstehen aus der Bedeutung der Teilchengröße für die Lösungsgeschwindigkeit der Arzneistoffe, sobald physikalisch-chemische Vorgänge während der Herstellung, Lagerung und Applikation der Arzneiform zu Veränderungen der Teilchengrößen des verarbeiteten Arzneistoffes führen. Beispiele für solche Vorgänge sind Flockung und Kristallwachstum in Suspensionen, Kaltschweißung von Kristallen bei der Tablettenpressung und ungenügender Tablettenzerfall im Verdauungstrakt.

Zur Unterdrückung dieser unerwünschten Erscheinungen sind Kenntnisse ihrer Ursachen Voraussetzung. Die Gewinnung dieser Kenntnisse erfordert die Untersuchung von Teilchengrößenveränderungen an Arzneiformen mit Hilfe geeigneter Teilchengrößenanalysenverfahren. Neben der Sedimentationswaage, der Andreasen-Pipettiermethode und der mikroskopischen Analyse ist ein neuartiges Analysengerät für derartige Untersuchungen wichtig geworden: der 1953-56 von W.H. Coulter entwickelte Coulter Counter.

Ursprünglich nur für Erythrozyten- und Bakterienzählung konstruiert |5,6,31|, wird der Coulter Counter heute in verschie-

denen Ausführungen (Modell A, B, D, F) in allen Fachbereichen, die sich mit Teilchengrößenanalysen befassen, eingesetzt. Ein umfangreiches, von der Herstellerfirma Coulter Electronics Ltd. zusammengestelltes Literaturverzeichnis belegt dies |11|.

Nach dem Coulter-Prinzip arbeitet auch das in Schweden gebaute "Celloscope 202" und das in der DDR entwickelte "TuR ZG 1" |4,25|. Der Meßbereich des Coulter Counters von ca. 1-300 µm geht über die untere Grenze der Siebanalyse bei ca. 10 µm hinaus. Das Gerät ermöglicht die außerordentlich rasche Zählung und Messung der Volumina von Teilchen, die in einem Elektrolyten suspendiert sind. Zu den Vorteilen der großen Meßgeschwindigkeit, des Teilchenzählens und der Volumenmessung kommt oft als weiterer Vorzug der geringe Substanzbedarf hinzu.

Aufgrund dieser Vorteile gegenüber anderen geeigneten Verfahren und der in der Literatur hervorgehobenen großen Meßgenauigkeit und Empfindlichkeit des Gerätes wurde ein Modell B des Coulter Counters zur Analyse von Teilchengrößenveränderungen beim Verpressen von Arzneistoffen zu Tabletten vorgesehen.
Bereits die ersten eigenen Messungen an Arzneistoffen führten jedoch zu Zweifeln an der Meßgenauigkeit des Gerätes:
Zur Messung müssen die Teilchen eine Bohrung des gerätspezifischen Meßwandlers passieren, deren Durchmesser sich nach dem auszumessenden Teilchengrößenbereich richtet. Mit allen zur Verfügung stehenden Bohrungen verschiedener Durchmesser wurden Arzneistoffe und Eichsubstanzen ausgemessen und die erhaltenen Verteilungskurven verglichen. Bei diesem Vergleich ergaben sich wesentliche Abweichungen der Kurven untereinander, d.h. die Verteilungswiedergabe war wenigstens bei einem Teil der verwendeten Meßwandler falsch.

Aus diesem Grund ergab sich die Notwendigkeit, Prüfungen des Coulter Counters vorzunehmen, um Kenntnisse über folgende Punkte zu erlangen:

1. Ursache einer falschen Verteilungswiedergabe durch den Coulter Counter
2. Erforderliche Einschränkungen der Verwendbarkeit des Gerätes zu Teilchengrößenanalysen
3. Behebung der falschen Verteilungswiedergabe durch Korrektur des Meßergebnisses oder technische Verbesserung des Gerätes.

2. FUNKTION UND AUFBAU DES COULTER COUNTERS

2.1 Beschreibung des Meßprinzips und des Gerätes.

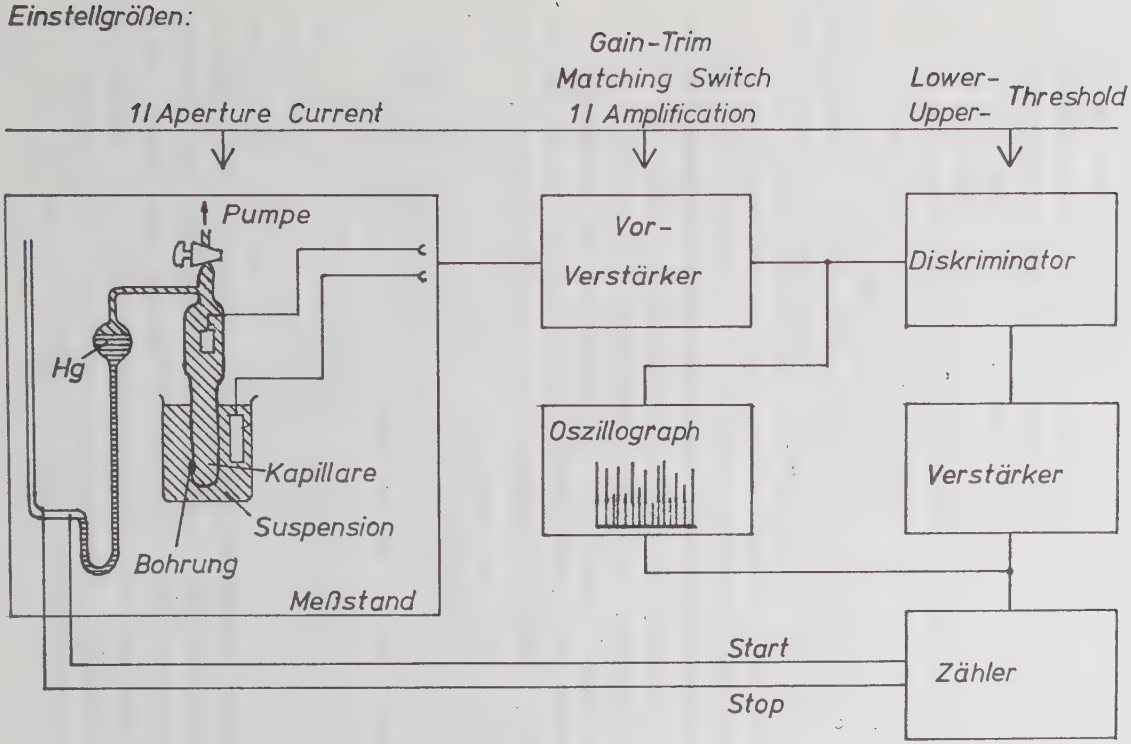
Der Coulter Counter ermöglicht die Aufnahme von Anzahl-Verteilungen mit dem Teilchenvolumen als Dispersitätsgröße. Teilchendurchmesser bzw. -oberfläche werden durch Umrechnung aus dem gemessenen Teilchenvolumen erhalten.

Beim Coulter Counter-Verfahren wird eine elektrisch leitende Suspension der Teilchen durch eine Kapillarbohrung gesaugt, deren elektrischer Widerstand sich beim Durchtritt eines Teilchens proportional zu dessen Volumen ändert. Aus der Widerstandsänderung wird ein Spannungsimpuls abgeleitet, der verstärkt, diskriminiert und gezählt wird.

Das Blockschaltbild in Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau des Gerätes und die beim Modell B vorhandenen Einstellgrössen. Im einzelnen ist daraus zu entnehmen: Zwei Elektroden sind durch eine Glaswand voneinander getrennt, in der sich eine zylindrische Bohrung befindet. Der die Bohrung tragende Teil ist auswechselbar und wird im Folgenden als "Kapillare" bezeichnet. Es stehen Kapillaren mit Bohrungen verschiedenen Durchmessers zwischen 1 und 3oo µm zur Verfügung. Der auszumessende Teilchengrößenbereich bestimmt die Wahl des Bohrungsdurchmessers. Die Länge der Bohrung beträgt im allgemeinen 2o- 5o µm.

Zur Messung wird ein an die Kapillare angeschlossenes Hg-Manometer durch einen Unterdruck von 2oo mm Hg aus seiner Gleichgewichtslage gebracht (siehe auch Abschnitt C 1.3). Nach Schließen des Hahnes zur Vakuumleitung steigt das Quecksilber im einen Manometerschenkel wieder in dem Maße, wie durch den Außendruck die Teilchensuspension durch die Kapillarbohrung gedrückt wird. In das Manometerrohr sind

Abb. 1



Blockschaltbild des Coulter-Counters

zwei Kontakte eingeschmolzen. Berührt die Quecksilbersäule den ersten Kontakt, wird das Zählwerk eingeschaltet. Bei Berührung des zweiten Kontaktes durch das weitergeflossene Quecksilber wird es wieder ausgeschaltet. Das Manometervolumen zwischen den Kontakten beträgt o,5 ml; bei Ausfüllung dieses Volumens durch das Quecksilber hat die gleiche Volumenmenge an Teilchensuspension die Kapillarbohrung passiert und dabei durch Teilchen hervorgerufene Widerstandsänderungen sind als Spannungsimpulse registriert worden. Diese Konstruktion des Meßstandes ermöglicht das Messen und Zählen der Teilchen bei konstantem Meßvolumen V_m = o,5 ml.

Der mit fünf Dekaden-Zählröhren ausgestattete Zähler wird beim Modell B von einem Diskriminator mit je einer kontinuierlich veränderbaren unteren und oberen Schwelle gesteuert. Es werden entweder nur die Impulse gezählt, deren Amplitude zwischen den eingestellten Schwellwerten liegt, oder bei ausgeschalteter oberer Diskriminatorschwelle diejenigen Impulse, deren Amplitude größer ist als der gerade eingestellte untere Schwellwert. Jeder Impulshöhe kann damit ein Punkt t´ auf der Schwellwertskala zugeordnet werden.

Nacheinander erfolgende Zählungen bei konstantem Meßvolumen V_m und ansteigendem Schwellwert t´ ermöglichen die Aufstellung einer Anzahl-Rückstandssummenverteilung mit t´ als Dispersitätsgröße. Unter der Voraussetzung, daß zwischen Spannungsimpuls und Teilchenvolumen V eine lineare Beziehung besteht, erhält man V aus t´gemäß:

$$V = k\, t' \,. \qquad (1)$$

Die Konstante k wird durch Eichung des Gerätes mittels Teilchen bekannter Volumina erhalten. Eine Berechnung des Wertes der Konstanten k anstelle seiner Ermittlung durch eine Eichung ist nicht sinnvoll, da k den Verstärkungsfaktor des Gerätes für die Spannungsimpulse enthält, der sich infolge Alterung der Elektronenröhren mit der Zeit ändert.

Die Impulse werden weiterhin auf einen Oszillographen mit fester Horizontalablenkung gegeben, die so bemessen ist, daß die Impulse als senkrechte Striche verschiedener Länge erscheinen. Das Impulsbild dient zur Kontrolle von Störungen am Meßstand (z.B. verstopfte Bohrung) und zur Wahl geeigneter Verstärkungsstufen bzw. zweckmäßiger Schwellwerte.

2.2. Ermittlung des Teilchenvolumens

Während des Durchgangs eines Teilchens durch die Bohrung sei vom Teilchenvolumen V die Widerstandsänderung

$$\Delta R = k' V \qquad (2)$$

hervorgerufen worden. Die resultierende Spannungsänderung ist dann

$$\Delta U = \Delta R \; I \qquad (3)$$

Die Stromstärke I kann mit einem Stufenschalter am Gerät zwischen 0,0625mA und 4,0mA bei jedem Schaltschritt verdoppelt werden.
Der Stufenschalter ist mit " 1/Aperture Current" bezeichnet. Die Stufen sind mit Faktoren m_i zwischen 1/8 (bei 4,0mA) und 8 (bei 0,0625mA) versehen.

Der durch die zeitliche Spannungsänderung entstandene Impuls wird von einem dreifach regelbaren Vorverstärker verstärkt. Zum Anpassen der Spannungsimpulse an den Diskriminatorspannungsbereich dient der mit " 1/Amplification" bezeichnete Stufenschalter, der zehn, mit den Faktoren m_v = 64 (bei kleinster Verstärkung) bis m_v = 1/8 (bei größter Verstärkung) bezeichnete Stufen hat. Bei jedem Schaltschritt wird die Verstärkung verdoppelt.
Die Anpassung des Vorverstärkers an den Bohrungswiderstand

$$R = 1/(q \kappa) \qquad (4)$$

q = Bohrungsquerschnitt
l = Bohrungslänge
κ = Leitfähigkeit des Elektrolyten

erfolgt durch einen "Matching Switch"-Schalter mit sechs, jeweils die Verstärkung verdoppelnden Schaltstufen MSw, die mit den Faktoren MSw = 128 (bei 10 kOhm Bohrungswiderstand) bis MSw = 4 (bei 320 kOhm) bezeichnet sind. (In Gleichung (4) ist der Widerstand zwischen den Elektroden als in der Bohrung vereinigt gedacht).

Eine von m_v und MSw festgelegte Verstärkung kann durch einen "Gain Trim"-Regler noch stufenlos zwischen mit 0 und 100 bezeichneten Grenzen verändert werden. Dies ist z.B. nötig zur Nacheichung des Gerätes.

Die Amplitude des bei festgehaltenem Gain Trim verstärkten Spannungsimpulses kann mit der stufenlos einstellbaren Diskriminatorspannung verglichen und somit gemessen werden. Entspricht diese Diskriminatorspannung einem Schwellwert ("Threshold") t', so ist unter Berücksichtigung des Verstärkungsfaktors A des Gerätes

$$t' = \Delta U \; A \; .$$

Mit der Beziehung (3) für ΔU ergibt sich:

$$t' = \Delta R \;\; I \; A \; .$$

Ersetzt man ΔR durch den Ausdruck (2) und löst nach dem Teilchenvolumen V auf, so erhält man:

$$V = t' \; (1/k') \; (1/I) \; (1/A). \qquad (5)$$

Führt man in diese Gleichung für 1/I die Einstellgröße m_i und für 1/A die Einstellgrößen m_v und MSw ein, erhält man aus 1/k' eine neue Konstante K_V. Diese Konstante K_V ist der durch Eichung zu ermittelnde Eichfaktor für Gain Trim = const.

Das Teilchenvolumen V wird also aus den Einstellgrößen des Gerätes und dem Eichfaktor K_V ermittelt nach:

$$V = t' \; m_i \; m_v \; MSw \; K_V \quad (Gain\ Trim = const). \quad (6)$$

Zur Vereinfachung der Schreibweise werden die Einstellgrößen zu einem Faktor $P = m_i \; m_v \; MSw$ zusammengefaßt und der erweiterte Schwellwert

$$t = t' \; P$$

gebildet.
Damit ergibt sich das Teilchenvolumen V zu

$$V = K_V \; t \; . \quad (7)$$

Im Folgenden wird dieser erweiterte Schwellwert t als Abszissenmerkmal bei der graphischen Ermittlung des Eichfaktors K_V (siehe Abschnitt 3.1) und bei Verteilungsdarstellungen verwendet.

2.3. Beziehung zwischen Widerstandsänderung und Teilchenvolumen

Theoretische Ableitungen der teilchenvolumen-abhängigen Widerstandsänderung wurden von BATCH |2|, KUBITSCHEK |32|, GREGG und STEIDLEY |17|, BERNHARDT und SCHICKEL |4|, sowie HEIDENREICH |25| u.a. entwickelt.

Eine vereinfachte Beziehung wird erhalten, wenn man das Volumen der Bohrung als von einem homogenen elektrischen Feld durchsetzt betrachtet und einen Teil dieses Volumens durch das Volumen V eines nichtleitenden Teilchens ersetzt. Es ergibt sich folgende Beziehung für $\Delta R = f(V)$ bei einem zylindrischen Teilchen, dessen Achse in der Bohrungsachse liegt |32|:

$$\Delta R = \frac{V}{\kappa \; q^2} \quad (1-a/q)^{-1} \quad (8)$$

κ = Leitfähigkeit des Elektrolyten
q = Bohrungsquerschnittsfläche
a = Teilchenzylinderquerschnitts-Fläche

Bis auf den Term a/q ist also ΔR proportional dem Teilchenvolumen V.
Der Einfluß der Größe a/q auf die Proportionalität zwischen der Widerstandsänderung ΔR und dem Teilchenvolumen V kann nach Angabe des Geräteherstellers |10| vernachlässigt werden, wenn der größte zu messende Teilchendurchmesser d kleiner ist als der Wert 0,4 D (D = Bohrungsdurchmesser). Der Teilchengrößenmeßbereich einer Kapillare wird demgemäß mit 2-40% ihres Bohrungsdurchmessers angegeben. Die untere Grenze des Meßbereiches ergibt sich aus dem Auftreten von Impulsen durch elektronisches Rauschen.

Für ein nichtleitendes, kugelförmiges Teilchen erhält man |17|:

$$\Delta R = \frac{V}{\kappa \pi^2 r_2^4} \quad \frac{1 + 0{,}3\,K^2 + 0{,}13\,K^4 + \ldots}{\sqrt{1 - K^2}} \qquad (9)$$

r_1 = Teilchenradius

r_2 = Radius der Bohrung

$K = r_1/r_2$.

GREGG und STEIDLEY |17| haben durch Messungen an einem Kapillarbohrungsmodell im elektrolytischen Trog gezeigt, daß die Teilchenform die Widerstandsänderung ΔR bei Durchgang eines Teilchens durch die Bohrung wesentlich stärker mitbestimmt, als z.B. in Gleichung (8) durch den Term a/q ausgedrückt wird. Nach Angaben der Autoren liefern die zur Verfügung stehenden Beziehungen für $\Delta R = f(V)$ nur Mindestwerte der Widerstandsänderung. HACKENBERG |21| gibt an, daß neben der Teilchenform auch die Oberflächenbeschaffenheit der Teilchen die hervorgerufene Widerstandsänderung beeinflußt. Der Autor leitet dies aus den unterschiedlichen Eichfaktoren K_V ab, die nach der Volumeneichmethode (siehe 3.1) mit

Substanzen glatter bzw. rauher Oberfläche erhalten werden. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis fand ECKHOFF |12| mit ähnlichen Substanzen eine reine Volumenabhängigkeit der Widerstandsänderung.

Theoretisch beeinflußt auch die Eigenleitfähigkeit der Teilchen die Widerstandsänderung der Bohrung. Nach Untersuchungen von BERG |3| kann dieser Effekt für feste Teilchen vernachlässigt werden.

Aus dem Vorausgehenden ergibt sich, daß die Beziehung zwischen Teilchenvolumen und Widerstandsänderung durch die vorhandenen Bestimmungsgleichungen nicht ausreichend erfaßt wird. Das Fehlen aufwendigerer Bestimmungsgleichungen ist jedoch für die Meßpraxis von geringer Bedeutung aus folgenden Gründen:

1. Das Gerät kann mit der Volumeneichmethode mit den zu messenden Teilchen selbst geeicht werden.
2. Als Durchmesser eines gemessenen unregelmäßigen Teilchens kann sowieso nur der Durchmesser einer Kugel angegeben werden, deren Volumen denselben, als Meßgröße dienenden physikalischen Effekt hervorruft wie das gemessene Teilchen.
   Es besteht hier das gleiche Problem wie bei allen anderen Teilchengrößenanalysenmethoden, wenn Dispersitätsmerkmale unregelmäßig geformter Teilchen angegeben werden sollen.

Zu beachten ist jedoch die Beschränkung des Meßbereiches der Kapillaren durch das Verhältnis von Teilchendurchmesser zu Bohrungsdurchmesser, der sich aus den zur Verfügung stehenden Bestimmungsgleichungen ergibt.

3. EICHUNG DES COULTER COUNTERS

3.1. Gebräuchliche Eichmethoden

Der Wert des Eichfaktors K_V ist abhängig vom Bohrungsdurchmesser der Kapillare und der Leitfähigkeit des verwendeten Elektrolyten. Dies geht aus den Beziehungen (8) und (9) für die Widerstandsänderung ΔR und das Teilchenvolumen V in Verbindung mit den Gleichungen (2), (5) und (6) hervor (Abschnitt 2.2. bzw. 2.3.). Zur Bestimmung des Eichfaktors K_V für eine gegebene Kapillare und einen gegebenen Elektrolyten benutzt man die Beziehung (7):

$$V = K_V \, t \, .$$

Der erweiterte Schwellwert t ist das Produkt aus dem abzulesenden Schwellwert t' und den zusammengefaßten Einstellgrößen $P = m_i \, m_v \, MSw$: $t = t'P$.

Gebräuchlich sind zwei Eichmethoden.

1. Methode:
Man ermittelt die Häufigkeitsverteilung einer Substanz bekannter Dichte, wobei der erweiterte Schwellwert t als Dispersitätsgröße dient. Sofern keine Teilchen vorhanden sind, deren Volumen außerhalb des Meßbereiches des Gerätes liegt, erhält man durch Aufsummieren der Produkte von Klassenhäufigkeit n_i und mittlerem erweiterten Klassenschwellwert $\bar{t}_i$ das vom Coulter Counter im Meßvolumen V_m gemessene Substanzvolumen V_C zu:

$$V_C = K_V \, \Sigma_i \, n_i \, \bar{t}_i \, . \qquad (10)$$

Das im Meßvolumen vorhandene Substanzvolumen V_S läßt sich aus der Feststoffkonzentration C der Suspension, der Dichte ρ der Teilchen und aus dem Meßvolumen V_m berechnen:

$$V_S = C \, V_m / \rho \, . \qquad (11)$$

Setzt man $V_C = V_S$ und löst nach K_V auf, so erhält man:

$$K_V = C\, V_m \,/\, \rho \,\Sigma_i\, n_i\, \bar{t}_i \,. \qquad (12)$$

2. Methode:

Man stellt die mit einer anderen Teilchengrößenanalysen-Methode bestimmte Anzahl-Summenverteilung mit dem errechneten Volumen als Dispersitätsgröße graphisch dar, ebenso die mit dem Coulter Counter erhaltene Verteilung mit dem erweiterten Schwellwert t als Dispersitätsgröße. Wählt man dabei eine logarithmische Abszissenteilung für die Dispersitätsgrößen, erhält man K_V aus dem Abstand der beiden Kurven in Abszissenrichtung gemäß:

$$V = K_V\, t$$

$$\log V = \log K_V + \log t \,. \qquad (13)$$

Diese Methode ist nur bei kugelförmigen Teilchen genau, hat aber den Vorteil, die Wiedergabegenauigkeit für die ganze Verteilung erkennen zu lassen. Das Kriterium für die Wiedergabegenauigkeit ist dabei die Parallelität der Kurven.
Beim Vergleich der in den folgenden Abbildungen gezeigten Kurven ist daher stets die Steigung der Kurven zu beachten, nicht ihr seitlicher Abstand.
Verlaufen die Kurven nicht in allen Abschnitten parallel, kann daraus nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß K_V nicht über den ganzen Meßbereich konstant ist.
Der K_V-Wert wurde stets aus Rückstandssummenkurven ermittelt. Der Kurvenabstand in Abszissenrichtung bei 50% Rückstandssumme diente zur Berechnung von K_V.

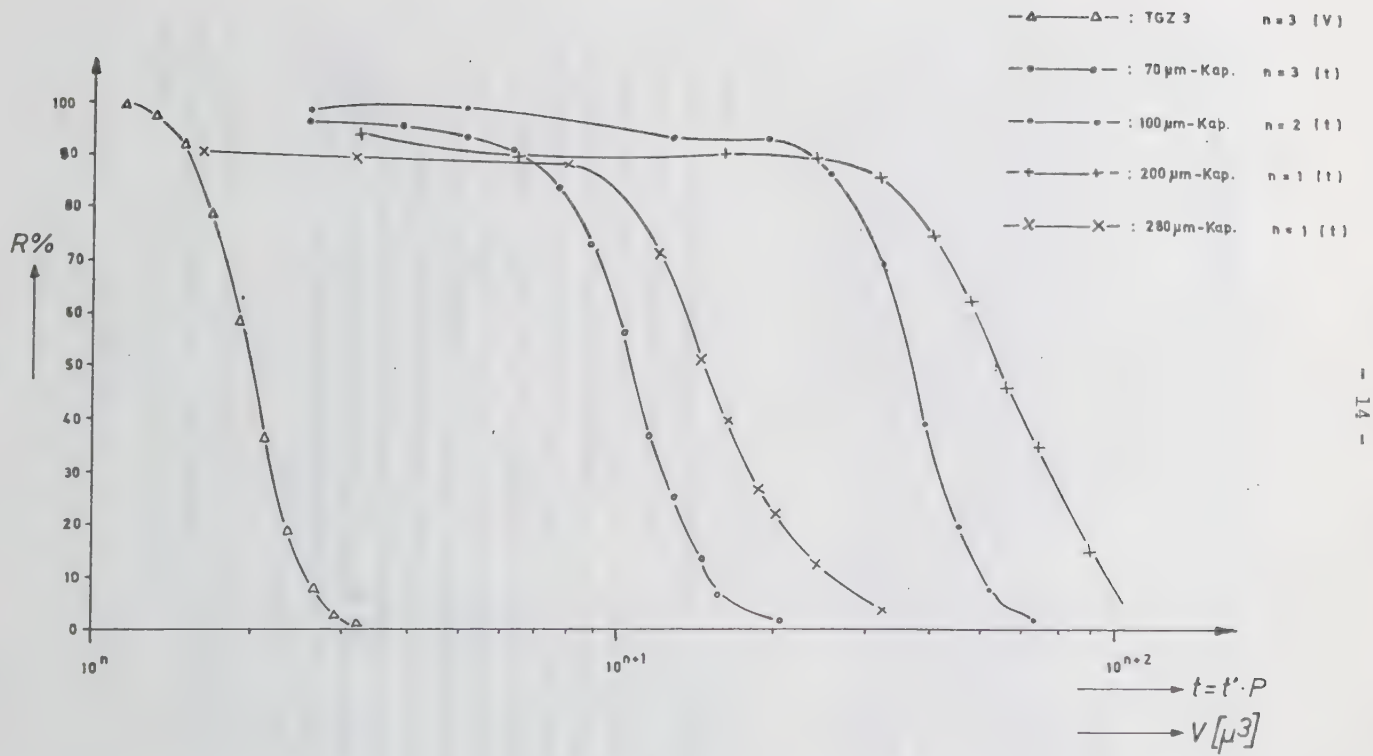


Abb. 2

Anzahl-Rückstandssummenverteilung von Nettle-Pollen 15,5 um , Teilchenkonz.: 2 600 l 0,5 ml, in Abhängigkeit vom Kapillardurchmesser.

3.2. Ergebnisse der Eichung des Coulter Counters für Kapillaren verschiedener Bohrungsdurchmesser

Die beabsichtigte Verwendung des Coulter Counters zur Bestimmung der Teilchengrößenverteilung von Arzneistoffen mit unterschiedlichem Feinheitsgrad erforderte die Ermittlung der Eichfaktoren für Kapillaren mit folgenden Bohrungsdurchmessern:

30, 50, 70, 100, 200, 280µm.

Die 200µm-Kapillare weist im Gegensatz zu den anderen Kapillaren keine zylindrische Bohrung auf; bei ihr erweitert sich die Öffnung auf der dem Suspensionseintritt abgewandten Seite mit einem Winkel $>90^{\circ}$.

Zur Eichung dieser Kapillaren wurden zunächst die vom Hersteller des Geräts gelieferten Pupp-Ball Sporen (d = 3,0µm) und Nettle Pollen (d = 15,5µm) verwendet.
Diese Sporen und Pollen sind kugelförmig und haben eine glatte Oberfläche.

In Abb. 2 sind die zur Anwendung der 2. Eichmethode nötigen Rückstandssummenkurven von Nettle Pollen dargestellt, wie sie durch eine mikroskopische Ausmessung mit Hilfe des Teilchengrößenanalysators TGZ 3 und durch Coulter Counter-Messungen mit verschiedenen Kapillaren (70-280µm) erhalten wurden.
Den Kurven ist folgendes zu entnehmen:

1. Die Coulter Counter-Kurven stimmen nicht mit der TGZ 3-Kurve überein.
2. Die mit den einzelnen Kapillaren erhaltenen Kurven stimmen untereinander nicht überein.
3. Mit zunehmendem Bohrungsdurchmesser werden die Verteilungen breiter wiedergegeben.

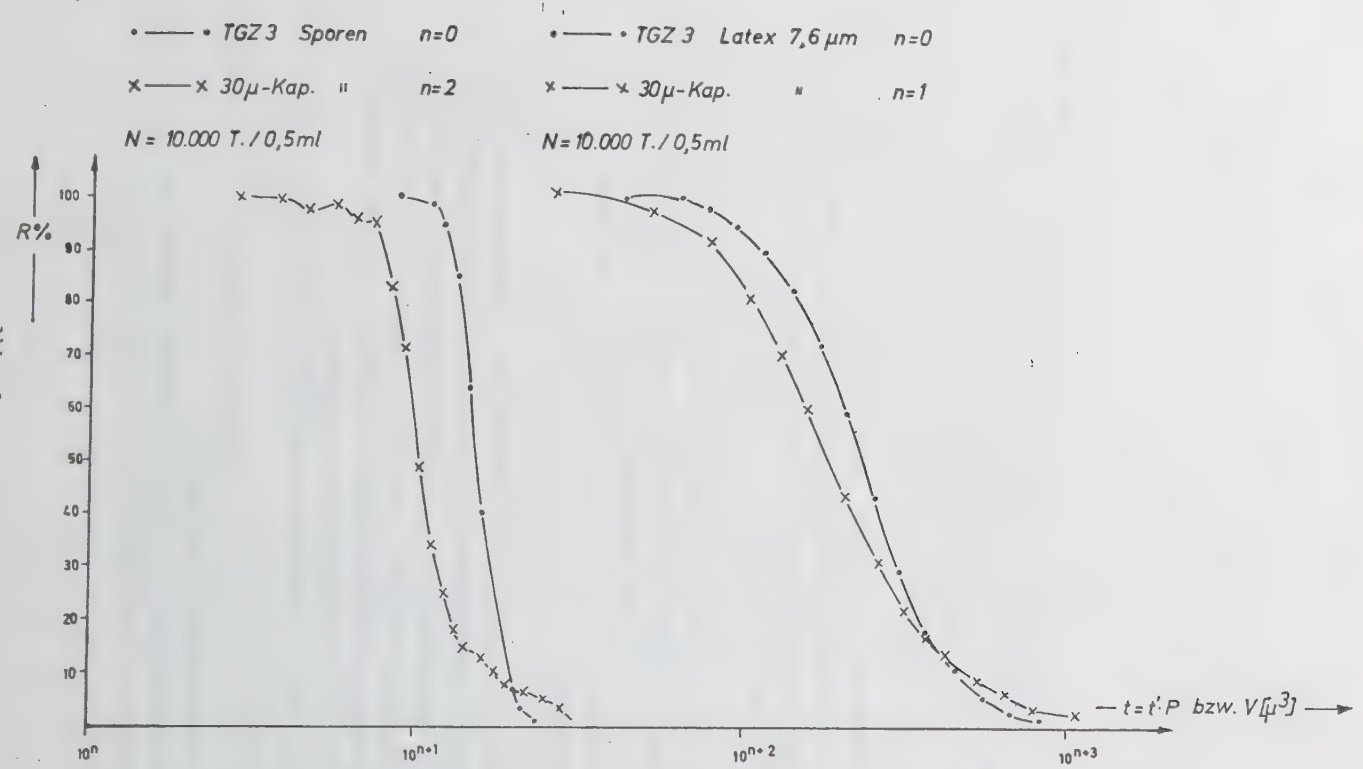


Abb. 3

Rückstandssummenverteilung von Pupp-Ball Sporen und Latex 7,6µm

Die mit der 30µm-Kapillare für Pupp-Ball Sporen bestimmte Summenkurve deckt sich ebenfalls nicht mit der TGZ 3-Kurve (Abb. 3). Der Grund für diese abweichende Verteilungswiedergabe ist das Vorhandensein von Paketen aus 3-4 Sporen in der Eichsubstanz. Diese Pakete lassen sich nicht dispergieren. Bei der TGZ 3-Bestimmung werden sie nicht erfaßt.
Daß die Veränderung der Summenverteilung nicht in dem beobachteten Ausmaß durch die Kapillare hervorgerufen wird, zeigen die ebenfalls in Abb. 3 dargestellten Summenkurven für Latex 7,6µm.

Zu breite oder verzerrte Verteilungen bei einem Modell A werden in Arbeiten von COOPER |9|, WACHTEL |55| und WALSTRA |58| wiedergegeben bzw. erwähnt.

Soweit die Autoren darauf eingehen, führen sie als mögliche Ursachen der veränderten Wiedergaben von Verteilungen Fehler im elektrischen System des Gerätes oder Koinzidenzerscheinungen an, ohne sich jedoch näher damit zu befassen.
KUBITSCHEK |33,34| nennt als Grund für diese Erscheinung einen Auflösungsverlust des Gerätes, der bei zu geringen Bohrungslängen auftreten soll.

Um die Ursache der unterschiedlichen Verteilungswiedergabe aufzuklären, wurde als erstes untersucht, wie weit die Verteilungen reproduzierbar sind, wenn die elektrischen Einstellgrößen des Gerätes variiert werden. Damit die elektrischen Eigenschaften des Modells B mit denjenigen des schon eingehender untersuchten Modells A verglichen werden konnten, wurden von NIEDIEK |41| beschriebene Prüfungen eines Modells A auch am Modell B vorgenommen.

4. PRÜFUNGEN DES GERÄTES ZUR ERMITTLUNG DER URSACHE UNTERSCHIEDLICHER VERTEILUNGSWIEDERGABE MIT KAPILLAREN VERSCHIEDENEN BOHRUNGSDURCHMESSERS

4.1. Untersuchungen am elektrischen Teil des Coulter Counters

Als Fehlerquellen kommen hier in Betracht:

a) Den Schaltstufen m_i nicht entsprechender Anstieg der Stromstärke.
b) Unzureichende Spannungskonstanz während der Meßzeit infolge Polarisationserscheinungen an den Elektroden.
c) Nichtlinearer Anstieg der Diskriminatorspannung mit dem Schwellwert t'.
d) Den Schaltstufen m_v und MSw nicht entsprechender Verstärkungsfaktor.

Ergebnisse der Messungen.

4.1.1. Stromstärken in Abhängigkeit von m_i

Die einstellbare Stromstärke zwischen den Elektroden wurde bei verschiedenen Elektrolytleitfähigkeiten und Bohrungsdurchmessern nachgeprüft.
Da mit Gleichstrom gearbeitet wird, kehrt man zur Unterdrükkung der Polarisation an den Elektroden vor jeder Einzelmessung die Stromrichtung mit einem Polungsschalter um. Die Messungen der Stromstärke wurden bei beiden Stellungen des Polungsschalters vorgenommen. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Man sieht, daß bei Position "L" des Polungsschalters die Stromstärken geringfügig erniedrigt sind (Zeile L der Tabelle). Die Stromstärken erwiesen sich als unabhängig vom Bohrungsdurchmesser und der Elektrolytleitfähigkeit. Mit der Einstellgröße m_i ist die Stromstärke durch folgende Beziehung

verknüpft:

$$I = 0{,}5\ 1/m_i\ |mA|.$$

Die unterschiedlichen Stromstärken bei L- bzw. R-Stellung des Polungsschalters führen zu verschieden großen Impulsamplituden für gleich große Teilchen. Bei konstantem Schwellwert t´ treten dadurch bei L-Stellung des Polungsschalters andere Zählwerte auf als bei R-Stellung. Der Einfluß dieser Zähldifferenzen auf den Verteilungsverlauf ist jedoch gering. Zweckmäßig ist es, bei jedem eingestellten Schwellwert die gleiche Anzahl Messungen bei beiden Stromrichtungen vorzunehmen und aus den erhaltenen Zählwerten den Mittelwert zu bilden.

Tabelle 1: Stromstärken bei den Schaltstufen m_i.

m_i		8	4	2	1	1/2	1/4	1/8
mA	L	0,05	0,11	0,23	0,49	1,00	2,0	3,9
	R	0,06	0,12	0,24	0,51	1,02	2,01	3,91

4.1.2. Spannungskonstanz während der Meßzeit

Für die 100µm-Kapillare und eine 1%ige NaCl-Lösung ergibt sich ein Kapillarwiderstand von 12 kOhm.
Es wurde der Spannungsanstieg über die Meßzeit verfolgt. Diese beträgt bei der 100µm-Kapillare 13 sec.. In dieser Zeit fließt das Meßvolumen von 0,5ml durch die Bohrung.
In Tabelle 2 sind die Spannungen bei vier Stromstärken nach Einschalten und nach Erreichen des konstanten Wertes eingetragen, der sich nach 10 sec. eingestellt hat.

Tabelle 2: Spannungsanstieg nach Einschalten des Stromes.

m_i	1	0,707	1/2	0,354
Volt L	5,89-5,95	8,40-8,42	11,8-11,8	16,6-16,6
R	5,96-5,99	8,40-9,20	11,6-12,3	16,4-17,3

Da zwischen Einschalten des Stromes und Beginn der Meßzeit eine beliebige Zeitspanne gelegt werden kann, ist es möglich, bei konstanter Spannung zu messen. Jedoch bringt dies wegen der bestehenden Spannungsdifferenz zwischen L- und R-Stellung des Polungsschalters keine Verbesserung des Meßergebnisses.

4.1.3. Lineare Abhängigkeit der Diskriminatorspannung U_D vom Schwellwert t´

Die Amplituden der durch Teilchen hervorgerufenen Spannungsimpulse werden meßbar durch ihren Vergleich mit den Diskriminatorspannungen U_D, denen Zahlenwerte des Schwellwertes t´zugeordnet sind. Damit der Proportionalitätsfaktor zwischen U_D und t´in die Eichkonstante K_V aufgenommen werden kann, muß zwischen beiden Größen eine lineare Beziehung bestehen, die über den ganzen Schwellwertbereich gültig ist.

Diese Forderung ist erfüllt, wie die Nachprüfung der Beziehung zwischen U_D und t´ergab. Die Messungen wurden nach der in Abschnitt 2.3 des experimentellen Teils angegebenen Methode durchgeführt. Über den ganzen Schwellwertbereich gilt die lineare Beziehung:

$$U_D = 25 + 0{,}78\ t' |\text{Volt}| .$$

4.1.4. Überprüfung der Verstärkungsfaktoren m_v und MSw.

Gemäß Gleichung (6) in Abschnitt 2.2. werden die Einstellgrößen m_v und MSw zur Berechnung des Teilchenvolumens aus dem Schwell-

wert t' benötigt:

$$V = K_V \; m_i \; m_v \; MSw \; t'$$

Zur Messung müssen die im Produkt $P = m_i \; m_v \; MSw$ zusammengefaßten Einstellgrößen so gewählt werden, daß die von den Teilchen hervorgerufenen und verstärkten Spannungsimpulse in den Diskriminatorbereich fallen. Da die Widerstandsänderung ΔR, die zum Spannungsimpuls führt, bei gegebener Teilchenverteilung vom Bohrungsdurchmesser und von der Elektrolytleitfähigkeit bestimmt wird, ist der Wert von P nur in engen Grenzen variierbar.

Um die Verstärkungsfaktoren ohne den zu einer elektrischen Messung nötigen Eingriff in das Gerät überprüfen zu können, wurde wie folgt verfahren.

Innerhalb konstanter P-Werte wurden m_i und m_v, bzw. m_i und MSw variiert und aus den gemessenen Verteilungen nach der 2. Eichmethode die Eichfaktoren K_V berechnet. Diese Eichfaktoren müssen konstant sein, wenn die Verstärkung streng proportional zu den Verstärkungsfaktoren m_v und MSw ist und die sich mit m_i ändernde Elektrodenspannung keinen Einfluß auf das Meßergebnis hat.

Um einen möglichen Einfluß von Koinzidenzerscheinungen (siehe Abschnitt 5.1.) auf den Eichfaktor auszuschließen, wurden die Messungen an einer Nettle Pollen-Suspension konstanter Konzentration vorgenommen. Die mit der 70µm-Kapillare erhaltenen K_V-Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Änderung von K_V mit m_v. 7o µm-Kap. 7ooo T./o,5 ml

MSw	m_v	m_i	P	Volt	K_V	Mittelwert K_V
64	2	4	512	2,25	o,167	
	4	2		4,5o	o,159	
	8	1		9,oo	o,163	
	16	1/2		18,oo	o,157	o,162 ± o,oo3
64	1	4	256	2,25	o,163	
	2	2		4,5o	o,165	
	4	1		9,oo	o,163	
	8	1/2		18,oo	o,161	o,163 ± o,oo2

Die mittlere Abweichung in K_V beträgt also nur ± 2 %, trotz unterschiedlicher Spannungen und Verstärkungsfaktoren m_v.
Für die 5o µm-Kapillare wurde mit 5 Bestimmungen bei P = 362 bzw. P = 256 der Eichfaktor zu o,159 ± o,ool (mittlere Abweichung: ± o,6 %) ermittelt.
Der Einfluß verschiedener MSw-Einstellungen auf K_V wurde bei der loo µm-Kapillare geprüft. K_V ergab sich zu o,452 ± o,oo6. Auch hier liegt also die mittlere Abweichung noch unter 2 %. Für die 3o µm und 28o µm-Kapillare ergaben sich ebenfalls keine größeren Abweichungen.

Die Ergebnisse dieser Prüfungen und die sehr gute Reproduzierbarkeit der Verteilungskurven hierbei für jede einzelne Kapillare zeigen, daß m_v, MSw und die Elektrodenspannung keine mögliche Fehlerquelle darstellen.

4.1.5 Überprüfung der Gain Trim-Verstärkungsregelung

Bei verschiedenen Einstellungen zwischen o und loo des stufenlosen Gain Trim-Reglers wurden Messungen an Pupp-Ball Sporen, Nettle Pollen und Latex (d = 29,3 µm) durchgeführt. Für K_V ergab sich eine lineare Abhängigkeit von der Gain Trim-Einstellung.
Die bei den Einstellungen o und loo erhaltenen Eichfaktoren $K_V(o)$ und $K_V(loo)$ sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Der Faktor $Q = K_V(o)/K_V(loo)$ zeigt, daß die Verstärkung der Impulse durch den Regler bis auf das 2,22fache erhöht werden kann. Während die Eichfaktoren für Nettle Pollen und Latex verschieden sind (siehe Abschnitt 4.2), ist Q unabhängig vom Kapillardurchmesser und der Eichsubstanz.

Tabelle 4: Eichfaktoren K_V bei Gain Trim o und loo.

Kap. 3o µm	K_V Pupp-Ball Sp.		Q Sporen			
G. Tr.	o	loo				
	o,o315	o,o143	2,2o			

	K_V Nettle Pollen		K_V Latex		Q Pollen	Q Latex	
Gain Tr.	o	loo	o	loo			
Kapillare							
7o	o,1ß2	o,o81	o,16o	o,o7o	2,24	2,24	
loo	o,524	o,24o	o,464	o,2o7	2,18	2,24	
2oo	3,47	1,59	2,81	1,26	2,18	2,23	
28o µm	12,81	5,64	11,25	4,95	2,27	2,27	Mw.: 2,22

Die Ergebnisse der elektrischen Prüfungen des Coulter Counters lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Die bei den beschriebenen Variationen der Einstellgrößen erhaltenen Verteilungskurven erwiesen sich in ihrem Verlauf als unabhängig von den gewählten Stromstärken, Verstärkungen und Diskriminatorbereichen. Die Eichfaktoren sind mit einer mittleren Abweichung von $\pm$ 2 % reproduzierbar. Stromstärke- und Verstärkungsstufen können voll ausgenutzt werden. Beim Modell A ist dies nach NIEDIEK |41| nicht der Fall. Es ergaben sich auch keine Fehlzählungen als Folge eines Verdampfens von Wasser in der Kapillarbohrung bei hoher Stromdichte. Die Ursache der nicht reproduzierbaren Verteilungswiedergabe beim Vergleich der Meßergebnisse verschiedener Kapillaren muß daher außerhalb des Verstärker- und Diskriminatorbereiches gesucht werden.

4.2 Abhängigkeit des Eichfaktors von der Eichsubstanz

Mit Latex und pflanzlichem Eichmaterial hat SHORT |48| voneinander abweichende Eichfaktoren erhalten. HACKENBERG |21| gibt ebenfalls nach der Volumen-Eichmethode bestimmte, differierende Eichfaktoren für Glas, Korund und Kaolin an. Der Autor führt die Differenzen auf unterschiedliche Formfaktoren und Oberflächenbeschaffenheiten der Substanzen zurück.
Da die Volumen-Eichmethode eine exakte Wiedergabe der Verteilungsdichte voraussetzt, die jedoch wegen der festgestellten Unterschiede bei Messungen mit mehreren Kapillaren nicht als gegeben angesehen werden konnte, wurde die Abhängigkeit des Eichfaktors von der Eichsubstanz nur unter Anwendung der zweiten Eichmethode und mit kugelförmigen Teilchen geprüft.

Außer den Substanzen: Pupp-Ball Sporen und Latex 7,6 µm für die 3o µm-Kapillare, bzw. Nettle Pollen und Latex 29,3 µm für die übrigen vier Kapillaren wurden auch Lycopodium Sporen (d = 28,4 µm) eingesetzt.
Die erhaltenen Eichfaktoren sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Es wurden für jede Kapillare nur die Substanzen verwendet, bei denen der mittlere Durchmesser d im Bereich von 2-4o % des Bohrungsdurchmessers liegt.

Tabelle 5: Eichfaktoren für verschiedene Eichsubstanzen (Gain Trim loo).

Kap.	Eichsubstanz				
	Pupp-Ball Sporen 3,o µm	Latex 7,6 µm	Nettle Pollen 15,5 µm	Latex 29,3 µm	Lycopod. Sporen 28,4 µm
3o	o,o143	o,o125	-	-	-
7o	-	o,o778	o,o814	o,o7o4	-
loo	-	-	o,24o	o,2o7	o,2o7
2oo	-	-	1,59	1,26	1,34
28o µm	-	-	5,64	4,95	5,59

Eine Abhängigkeit des Eichfaktors von der verwendeten Eichsubstanz ist deutlich zu erkennen. Offen bleibt jedoch die Frage, welche Teilcheneigenschaften außer dem Volumen den Wert des Eichfaktors mitbestimmen.
Berechnet man aus den Coulter Counter-Daten und dem Eichfaktor K_V Durchmesserverteilungen, beträgt die Unsicherheit für den Durchmesser durch Einführen der dritten Wurzel nur noch 2-3 %. Trotzdem sind weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Eichfaktorabhängigkeit geboten.

Aus einem Vergleich der Verteilungskurven, die für die einzelnen Eichsubstanzen mit den verwendeten Kapillaren erhalten wurden, ergibt sich, daß die Art der Eichsubstanz nicht die Verteilungswiedergabe durch die Kapillare beeinflußt. Für alle Eichsubstanzen blieben die Verteilungskurven der eingesetzten Kapillaren untereinander nicht reproduzierbar. Die Ursache hierfür mußte also weiterhin im Gerät gesucht werden.

4.3 Prüfung der Beziehung zwischen K_V und dem Bohrungsdurchmesser der Kapillaren

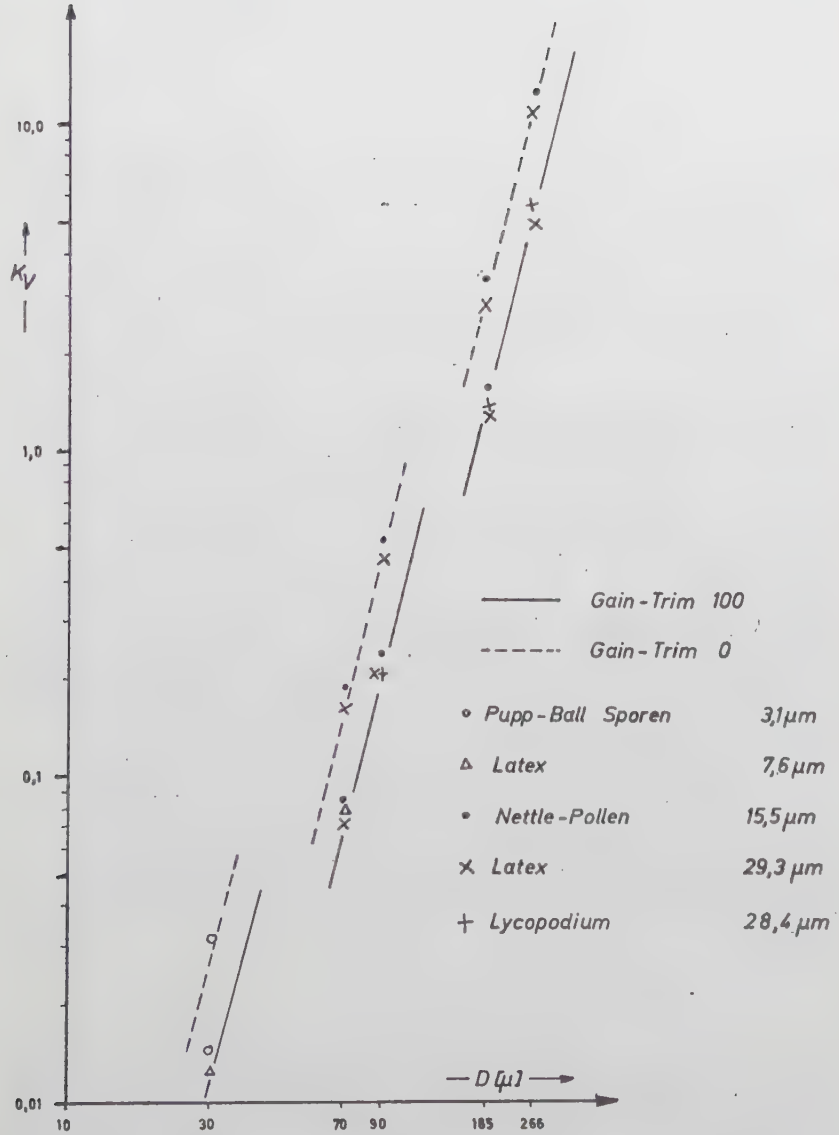
Gemäß den Gleichungen (8) und (9) in Abschnitt 2.3 ist ΔR für ein gegebenes Teilchenvolumen umgekehrt proportional der 4. Potenz des Bohrungsradius' r_2 bzw. -durchmessers D. Der Eichfaktor K_V wächst demnach mit D^4.

Führt man K_V in eine der obigen Gleichungen ein und logarithmiert, erhält man für die Beziehung zwischen K_V und D den Ausdruck

$$\log K_V = 4 \log D + \log \text{Konstante} \quad . \qquad (14)$$

Trägt man in einem Koordinatensystem $\log K_V$ über $\log D$ auf, muß sich eine Gerade mit der Steigung +4 ergeben.

Mit den Werten der Eichfaktoren in Tabelle 4 und den für die Bohrungsdurchmesser auf den Kapillaren angegebenen Werten wurde keine Gerade erhalten. Beim Nachmessen der Bohrungsdurchmesser unter dem Mikroskop stellte sich dann heraus, daß die auf den Kapillaren aufgedruckten Durchmesserwerte z.T. erheblich von den gemessenen Werten abweichen (Tabelle 6).
Mit den korrigierten Durchmesserwerten ergab sich der in Abb.4 dargestellte Zusammenhang zwischen K_V und D. Die Steigung zeigt zwar, daß die Eichfaktoren proportional zu D^4 sind; jedoch ist die Proportionalität für die 70 und 100 µm-Kapillare anders als für die 200 und 280 µm-Kapillare.



Abhängigkeit des Eichfaktors K_V vom Kapillardurchmesser.

Abb. 4

Tabelle 6: Nominelle und gemessene Bohrungsdurchmesser.

nominell	gemessen
3o	3o
5o	66
7o	7o
1oo	9o
2oo	185
28o µm	266 µm

Sowohl die Abhängigkeit des Eichfaktors von der Art der Eichsubstanz (Abschnitt 4.2) als auch die unterschiedlichen Proportionalitätsfaktoren zwischen K_V und den Bohrungsdurchmessern werfen erneut die Frage nach der Beziehung zwischen der Widerstandsänderung und dem Teilchenvolumen auf (siehe Abschnitt 2.3).

Es ist zu untersuchen, ob der Einfluß von Bohrungs- und Teilchenkapazität bzw. Elektrolyt- und Teilchenwiderstand auf die Impulsausbildung generell vernachlässigt werden kann, wie dies GREGG und STEIDLEY |17| für den speziellen Fall ihrer Messungen mit einer 9o µm-Bohrung von 75 µm Länge angegeben haben, oder ob die Zeitkonstante $\tau = R\,C$ der im Meßstand durch die Elektroden, die Bohrung und die Teilchen vorhandenen Kapazitäten C und Widerstände R von Bedeutung ist für die am Eingangskreis des Verstärkers auftretenden Impulsamplituden.

4.4 Bestimmung des Eichfaktors bei gleicher durchschnittlicher Impulsfolgefrequenz

Die Eichfaktoren der Tabellen 4 und 5 wurden für alle Kapillaren mit Teilchensuspensionen konstanter Konzentration von 7ooo T./o,5 ml ermittelt. Da die Durchflußgeschwindigkeit (ml/sec) der Suspension mit dem Quadrat des Bohrungsdurchmessers D ansteigt, ergeben sich bei konstanter Konzentration sehr unterschiedliche durchschnittliche Impulsfolgefrequenzen für die einzelnen Kapillaren. Es war aus diesem Grunde die Möglichkeit zu erwägen, daß die in Abschnitt 4.3 angeführte unterschiedliche Proportionalität zwischen Eichfaktor K_V und vierter Potenz des Bohrungsdurchmessers die Folge einer Frequenzabhängigkeit der Verstärkung ist.

Für eine Eichfaktorbestimmung bei gleicher durchschnittlicher Impulsfolgefrequenz $\bar{f}$ mit der 7o, 1oo, 2oo und 28o µm-Kapillare wurden die Teilchenkonzentrationen für $\bar{f}$ = 125o Hz berechnet. Diese Frequenz wurde gewählt, weil bei ihr auch die stark verzerrende 28o µm-Kapillare die wahre Teilchengrößenverteilung noch erkennen läßt.

Die Teilchenkonzentrationen bei $\bar{f}$ = 125o Hz betragen:

7o µm-Kap.	:	28 7oo T./o,5 ml
1oo	:	17 4oo
2oo	:	4 1oo
28o	:	2 ooo

Gezählt und gemessen wurde Nettle Pollen.

Auch bei gleicher durchschnittlicher Impulsfolgefrequenz blieb die unterschiedliche Proportionalität zwischen Eichfaktor und D^4 bestehen. Die geringe Frequenzabhängigkeit des Verstärkers und damit des Eichfaktors geht aus einer Messung bei extrem

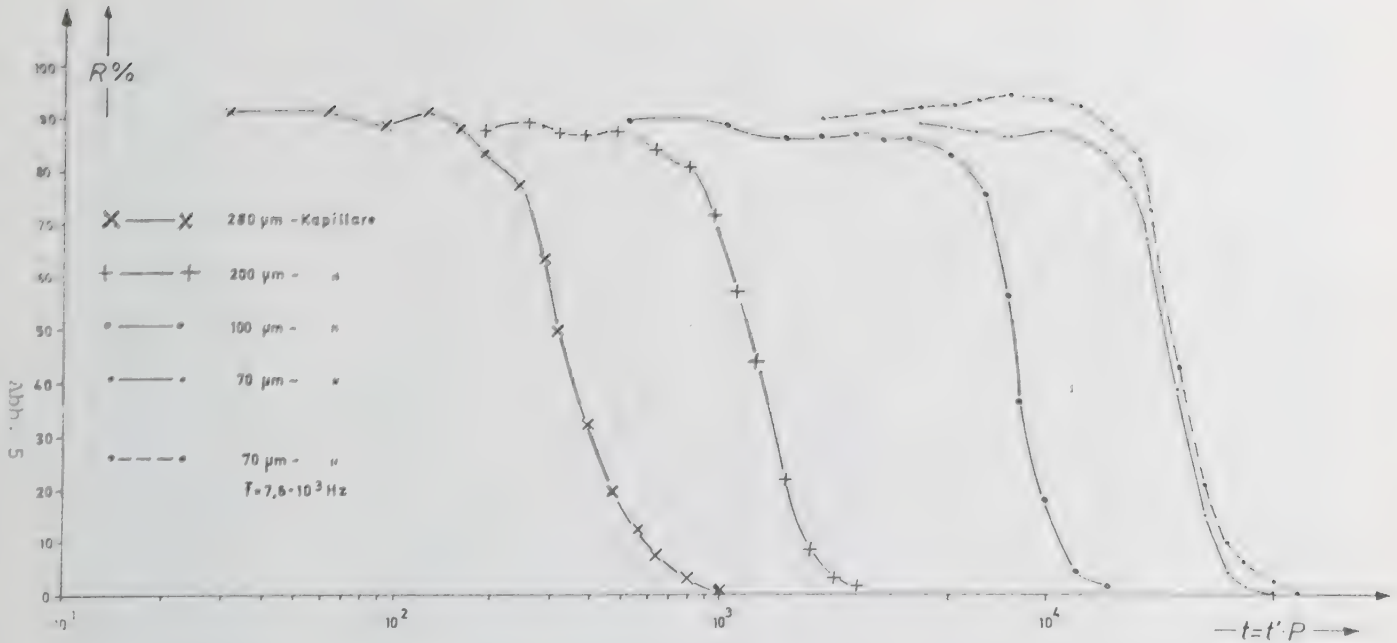


Abb. 5

Anzahl-Rückstandssummenverteilung von Nettle Pollen 15,5µm bei f=1250 Hz mit versch. Kapillaren.

hoher Impulsfolgefrequenz mit der 7o µm-Kapillare hervor:

Für eine Teilchenkonzentration von 19o ooo T./o,5 ml wird $\bar{f}$ = 7 6oo Hz. Der bei dieser Frequenz erhaltene Eichfaktor ist nur 3 % niedriger als der Eichfaktor bei $\bar{f}$ = 125o Hz. Interessant ist ein Vergleich der erhaltenen Rückstandssummenkurven (Abb.5). Die Kurven der 2oo und 28o µm-Kapillare zeigen einen erhöhten Anteil zu kleiner und zu großer Impulse an, der bei gleicher Impulsfolgefrequenz in den Kurven der 7o und loo µm-Kapillare nicht vorhanden ist. Selbst die bei 7 6oo Hz mit der 7o µm-Kapillare erhaltene Summenkurve entspricht besser der mikroskopisch bestimmten Teilchenverteilung (vgl. Abb.2), obwohl bei der hohen Teilchenkonzentration von $1{,}9 \times 10^5$ T./o,5 ml eher mit fehlerhafter Verteilungswiedergabe infolge Koinzidenzerscheinungen (siehe Abschn. 5.1) zu rechnen ist als bei 2 ooo bzw. 4 ooo T./o,5 ml.

4.5 Abhängigkeit des Eichfaktors von der Strömungsgeschwindigkeit der Teilchensuspension

Wie in Abschnitt 4.4 gezeigt wurde, übt die Durchflußgeschwindigkeit der Suspension (ml/sec) über die von ihr bestimmte Teilchenfolgefrequenz keinen Einfluß auf den Eichfaktor aus. Die Strömungsgeschwindigkeit (m/sec) kann aber eine Bedeutung für den Eichfaktor erlangen, wie aus Arbeiten von KUBITSCHEK |33,34| und NIEDIEK |41| hervorgeht. Von beiden Autoren wird für das Modell A eine Abhängigkeit der Impulsdauer und -höhe und damit des Eichfaktors von der Verweilzeit eines Teilchens im Bohrungsvolumen angegeben. Diese Verweilzeit ergibt sich aus Bohrungslänge und Strömungsgeschwindigkeit.

KUBITSCHEK führt an, daß bei den Bohrungslängen der üblichen Kapillaren (ca. 2o-5o µm) die bei der Teilchenpassage entstehenden Impulse zu kurz sein können, um vom Verstärker voll verstärkt zu werden. Wenn die Passagedauer der Teilchen von ihrer Dichte und Größe, sowie von der Ansauggeschwindigkeit

und dem Strömungsprofil in der Bohrung abhängt, werden sich verschiedene Impulsamplituden bei den einzelnen Teilchenarten ergeben. Der Autor gibt für das Modell A als kleinste, für den Verstärker ausreichende Impulsdauer 30 µsec an. Die Bohrungslänge soll das 2-3fache des Bohrungsdurchmessers betragen, um Impulsplateaus zu bekommen.

NIEDIEK |41| teilt als Ergebnis der Prüfung des Verstärkers eines Modells A mit, daß bei 20 µsec Impulsdauer die Amplituden voll verstärkt werden, jedoch bei 15 µsec auf 95%, bei 10 µsec auf 80% und bei 5 µsec auf 50% des Wertes bei 20 µsec zurückgehen. Diese Prüfung wurde mit Rechteckimpulsen vorgenommen. Die Messungen wurden durchgeführt, da für Pollen um 20% größere Eichfaktoren als für Quarz bestimmt wurden (Eichmethode 2). Als Ursache dafür werden zu große Beschleunigung (und damit zu kurze Verweilzeit) des Pollens aufgrund seiner geringen Dichte angegeben. NIFDIEK berichtet weiter, daß bei Erniedrigung der Strömungsgeschwindigkeit der Suspension auf die Hälfte der Eichfaktor für Pollen mit demjenigen für Quarz übereinstimmte.

Um Aussagen darüber machen zu können, ob die mit dem Modell A erhaltenen Befunde auch für das Modell B gültig sind, wurde eine entsprechende Untersuchung am Modell B vorgenommen. Die Strömungsgeschwindigkeit wurde dazu, wie in Abschnitt 1.4 des experimentellen Teils beschrieben, von 6 m/sec auf 3 m/sec gesenkt. Gemessen wurden Substanzen verschiedener Dichte und Form, nämlich Pollen (kugelförmig), Formaldehyd-Kasein und Quarz (beide unregelmäßig geformt). Ein Vergleich der Verteilungskurven, die bei normaler (6 m/sec) und halber Strömungsgeschwindigkeit erhalten wurden, ergab ein wesentlich anderes Verhalten des Modells B:

a) Die Dichte und Form der gemessenen Teilchen hat bei allen untersuchten Kapillaren (70, 100, 200, 280 µm) überhaupt keinen Einfluß auf die Impulshöhe bei den zwei Strömungsgeschwindigkeiten.

b) Bei der 7o und loo µm-Kapillare ist die Impulshöhe unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit.

c) Bei der 2oo und 28o µm-Kapillare nimmt die Impulshöhe für alle drei Substanzen um 6,3 % ab, wenn von normaler zu halber Strömungsgeschwindigkeit übergegangen wird. Dies ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung des Eichfaktors um 6,3 %, die in Gegensatz steht zu der von NIEDIEK gefundenen Erniedrigung des Eichfaktors bei halber Strömungsgeschwindigkeit.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind insofern von Bedeutung, als sie die Gültigkeit der von KUBITSCHEK |33,34| für das Modell A gegebenen Erklärungen des Auftretens verfälschter Verteilungskurven für das Modell B ausschließen. Darauf wird in Abschnitt 5.3 eingegangen. (Siehe auch Abschnitt 5.7: Oszillographische Untersuchungen der Impulse.)

4.6 Einfluß der Elektrolytleitfähigkeit auf den Eichfaktor

In der Betriebsanleitung |lo| für das Modell B wird angegeben, daß bei diesem Gerätetyp im Gegensatz zum Modell A die Impulshöhe weitgehend unabhängig von der Leitfähigkeit des Elektrolyten ist. So soll bei einer Abnahme des Kapillarwiderstandes von 15 kΩ auf 8,4 kΩ die Impulshöhe nur um 1 % abnehmen. Dies bedeutet eine entsprechende Zunahme des Eichfaktors ($V = K_V t$ = const.). Temperaturbedingte Leitfähigkeitsänderungen sind damit für die Konstanz des Eichfaktors während der Messung ohne Belang.

Diese Unabhängigkeit von der Elektrolytleitfähigkeit kann erreicht werden, wenn ein Stromverstärker mit hoher Eingangskapazität und niedrigem Eingangswiderstand verwendet wird. Bei konstanter Spannung ist die durch eine Widerstandsänderung dR hervorgerufene Änderung der Stromstärke dI gegeben durch:

$$I = U/R$$

$$dI/dR = - U R^{-2}$$

$$dI = - U\, dR/R^2 = - I\, dR/R \qquad \text{bzw.}$$

$$\Delta I/I = - \Delta R/R \quad . \qquad (15)$$

Auf der rechten Seite der Gleichung (15) läßt sich die Leitfähigkeit herauskürzen.

Die experimentelle Bestimmung der Eichfaktoren bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen für die 5o, 7o und loo µm-Kapillare ergab jedoch entgegen der Angabe der Herstellerfirma eine Zunahme der Impulshöhe mit abnehmendem Kapillarwiderstand, erkenntlich an dem kleiner werdenden Eichfaktor (Tabelle 7)

Tabelle 7: Eichfaktoren bei verschiedenen Kapillarwiderständen.

NaCl-Konz. (g/ml)	κ_{20°	5o µm-Kap. R (kΩ)	5o µm-Kap. K_V	7o µm-Kap. R	7o µm-Kap. K_V	loo µm-Kap. R	loo µm-Kap. K_V
2 %	$3{,}22 \times 10^{-2}$	15,5	o,155	13,6	o,153	1o,8	o,428
1 %	$1{,}8o \times 10^{-2}$	26,o	o,159	23,o	o,16o	18,o	o,446
o,5 %	$9{,}92 \times 10^{-3}$	46,o	o,161	44,o	o,172	32,o	o,513

Wenn sich auch geringe Leitfähigkeitsänderungen durch übliche Temperaturschwankungen nicht auf den Eichfaktor auswirken, so empfiehlt es sich doch, den Eichfaktor für jeden verwendeten Elektrolyten vor den eigentlichen Messungen zu bestimmen.

5. UNTERSUCHUNG DER KOINZIDENZERSCHEINUNGEN

Aus den Prüfungen des impulsverarbeitenden Teils des Coulter Counters hatten sich keine Gründe für die unterschiedliche Verteilungswiedergabe ableiten lassen.
Der Eichfaktor K_V erwies sich zwar als in noch nicht geklärter Weise abhängig von der Art der zur Eichung verwendeten Teilchen, von der Elektrolytleitfähigkeit und vom Bohrungsdurchmesser; diese Variablen beeinflußten aber bei den durchgeführten Versuchen nicht die Verteilungswiedergabe.
Die Untersuchungen wurden daher auf den impulserzeugenden Teil des Gerätes ausgedehnt. Es wurde geprüft, wie sich die Impulszahl und die Impulsgrößenverteilungsdichte mit dem Kapillar-Bohrungsdurchmesser, der Teilchenkonzentration und der Verteilungsbreite der Teilchen ändert. Ausgangspunkt war hierbei das Auftreten von Koinzidenz.

5.1 Begriff der Koinzidenz

Bei zufälliger Verteilung der Teilchen im Elektrolyten, die durch Rühren der Suspension aufrechterhalten wird, passieren mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zwei Teilchen die Kapillarbohrung in so kurzem zeitlichen Abstand voneinander, daß es nicht zur Ausbildung zweier Impulse kommen kann, da sich die durch die momentane Stromänderung bedingten Entladungs- und Aufladungsvorgänge an der Eingangskapazität des Verstärkers überlagern. Zwei oder mehr Teilchen rufen nur einen Impuls hervor. Dieser Effekt wird als Koinzidenz bezeichnet. Die Häufigkeit des Auftretens solcher Koinzidenzen nimmt mit der Teilchenkonzentration der Suspension und dem Bohrungsquerschnitt der Kapillaren zu.

Die Folge der Koinzidenz sind Zählverluste und Fehlzählungen. Der Zählverlust entsteht durch die Registrierung nur eines Im-

pulses trotz Durchgang von zwei oder mehr Teilchen durch die Bohrung. Die Amplitude dieses einen Impulses ist die Summe von Spannungsänderungen, die während der Teilchenpassage aufgetreten sind. Mit diesem Impuls wird einer Teilchengrößenverteilung ein Teilchen zugeordnet, das in ihr nicht enthalten ist und zwei oder mehr vorhandene Teilchen werden nicht erfaßt. Das ist die Fehlzählung bei Koinzidenz von Teilchen.
Die registrierte Impulsamplituden-Verteilungsdichte ist in diesem Fall nicht mehr repräsentativ für die Teilchengrößenverteilungsdichte, die bestimmt werden soll.

5.2. Charakterisierung der Auswirkung von Koinzidenz- und anderen Einflüssen auf das Meßergebnis

Zur Untersuchung der Koinzidenzerscheinungen wurde zunächst eine Teilchensuspension verwendet, deren Teilchenkonzentration durch mikroskopische Auszählung der im Meßvolumen von 0,5ml vorhandenen Teilchen zu 2600T./0,5ml ermittelt worden war. Damit sollte es möglich sein, den Zählverlust bei Bohrungen verschiedenen Durchmessers abzuschätzen.
Die mit den einzelnen Kapillaren erhaltenen Rückstandssummenkurven wurden verglichen mit der durch mikroskopische Ausmessung gewonnenen Rückstandssummenkurve.
Diese Untersuchung brachte folgende Ergebnisse (siehe hierzu Abb. 2):

a) Ein durch Koinzidenz bedingter Zählverlust ist bei obiger Teilchenkonzentration nicht festzustellen.
b) Es treten vermehrt niedrige Impulse auf. Dadurch wird ein erhöhter Anteil der Verteilung an kleinen Teilchen vorgetäuscht.
c) Zusätzlich erscheinen große Impulse. Die Coulter Counter-Verteilung zeigt einen höheren Anteil großer Teilchen an als die Mikroskop-Verteilung.

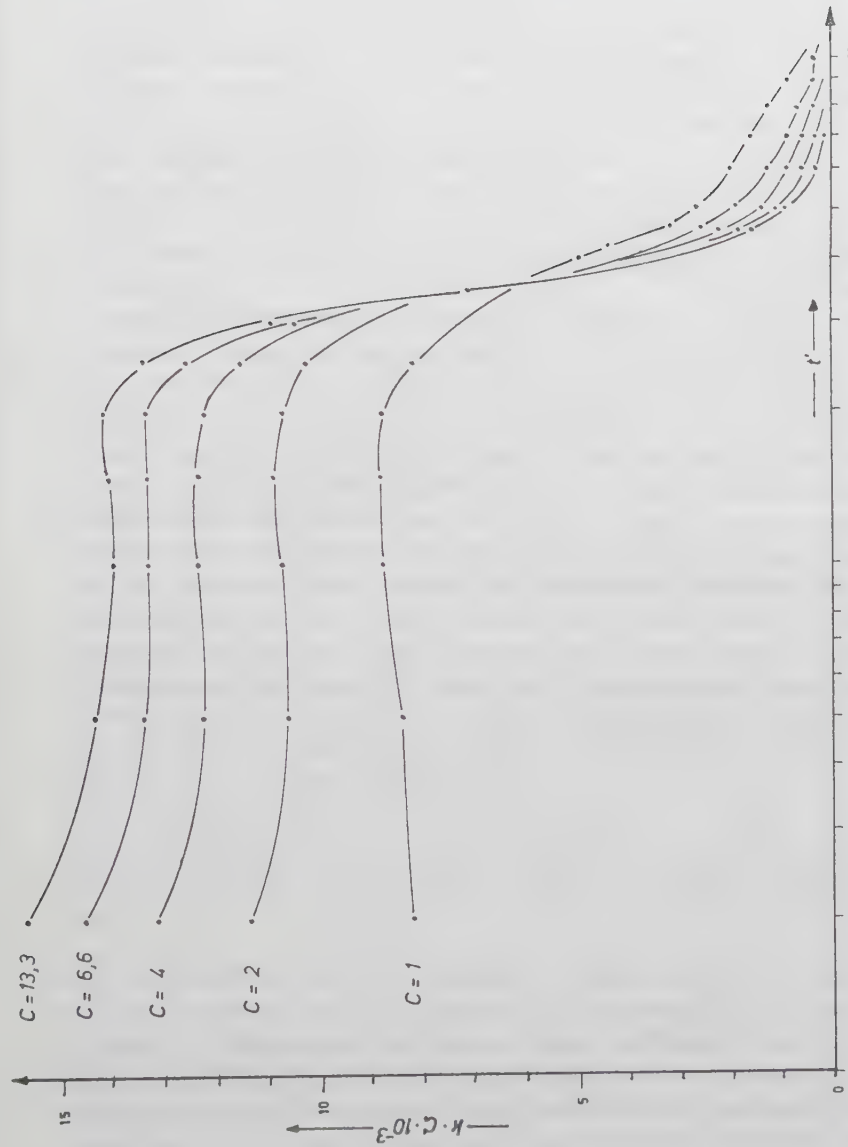

C = 13,3
C = 6,6
C = 4
C = 2
C = 1
k · C · 10⁻³
15
10
5
0
1
10
20
30
40
50
100
t'
Rückstandssummenverteilung von Lycopodium bei verschiedenen relativen Konz. 1/C
280 µm-Kapillare
k = 1,6 · 10⁴ T./0,5 ml

Abb. 6

d) Die Rückstandssummenkurven sind nicht stetig fallend, sondern zeigen zunächst einen leichten Anstieg. Der Abfall folgt erst auf ein Maximum.

Messungen mit der 280µm-Kapillare bei steigenden Teilchenkonzentrationen zwischen 1 200 T./0,5ml und 16 000 T./0,5ml ergaben zusätzlich (Abb. 6):

e) Die durch das vermehrte Auftreten kleiner und großer Impulse bedingte Verfälschung der Verteilung nimmt mit der Teilchenkonzentration zu.

Weiterhin zeigen die Messungen bei gleicher Impulsfolgefrequenz (Abb. 5):

f) Je größer der Bohrungsdurchmesser ist, um so deutlicher treten die unter a) bis d) genannten Erscheinungen schon bei niedrigen Teilchenkonzentrationen auf.

Für die Darstellung der Kurven in Abb. 6 sind die Zählungen zum besseren Vergleich auf die relative Konzentration 1/l (entspricht 16 000 T./0,5ml) umgerechnet worden. Die Konzentrationsabhängigkeit und das mögliche Ausmaß einer Verteilungsverfälschung sind deutlich zu erkennen. Dem Auftreten kleiner Impulse kommt dabei eine ebenso große Bedeutung für diese Verfälschung zu wie den durch Koinzidenz bedingten zu großen Impulsen. Bemerkenswert sind ferner die mit der Teilchenkonzentration anwachsenden Zählverluste infolge der Koinzidenz.

5.3. Übersicht der bisherigen Behandlung des Problems der Kurvenverfälschung in der Literatur

Die von mir beobachteten, vorausgehend beschriebenen Phänomene sind auch vom Modell A des Coulter Counters bekannt, jedoch gibt es für sie noch keine im ganzen befriedigenden Erklärungen. Im einzelnen findet man in der Literatur folgende Erklärungsversuche für falsche Verteilungswiedergabe:

a) Mit dem Auftreten zu vieler kleiner Impulse hat sich KUBITSCHEK |33,34| befaßt. In Abschnitt 4.5 wurde bereits dargelegt, daß der Autor die Impulsamplitude als von der Bohrungslänge und der Strömungsgeschwindigkeit abhängig angibt. Bei kurzen Kapillarbohrungen sollen Teilchen die Bohrung auf Bahnen schräg zur Bohrungsachse mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten passieren können. Dies führt bei einem Teil der Partikel dazu, daß der verstärkte Impuls nicht die volle, dem Teilchenvolumen entsprechende Amplitude erreicht. KUBITSCHEK bezeichnet diese Erscheinung als Auflösungsverlust. Diese Erklärung übernehmen COOPER |9| und WALSTRA |58| bei der Beschreibung verfälschter Verteilungen. Wie NIEDIEK |41| gibt auch WALSTRA eine Abhängigkeit des Eichfaktors von der Strömungsgeschwindigkeit der Teilchensuspension für das Modell A an. Für eine 50 µm-Kapillare erhält er bei halber Durchflußgeschwindigkeit (0,05ml/15 sec. statt 0,05ml/7 sec.) eine Erniedrigung des Eichfaktors um ca. 22%.
Eine Verringerung des Anteils zu niedriger Impulse kann aus den in der genannten Arbeit wiedergegebenen Kurven jedoch nicht abgeleitet werden.
Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beim Modell B eine Verlängerung der Passagezeit bei einer 100µm-Kapillare zu keiner Veränderung des Eichfaktors und bei einer 200µm-Kapillare zu einer Erhöhung des Eichfaktors um 6% bei unverändertem Auftreten zu vieler kleiner Impulse führt (Abschnitt 4.5).

Die von KUBITSCHEK gegebenen Erläuterungen gelten also nicht ohne weiteres für das Modell B.

b) Als Erklärung für das Vorkommen zu vieler großer Impulse wird die Aufsummierung von Impulsen herangezogen, also die eigentliche Koinzidenz. BRECHER |6| hat 1962 darauf aufmerksam gemacht, daß der unterschiedliche Abstand der Teilchen beim Passieren der Bohrung zu Impulsen Anlaß geben kann, deren Amplitude nicht proportional der Summe der Teilchenvolumina zu sein braucht.

Zuvor hatten WALES und WILSON |56| 1961 angenommen, daß bei Koinzidenz zwei Grenzfälle auftreten:

1. Die Impulsamplitude entspricht der Summe der Teilchenvolumina.
2. Die Impulsamplitude entspricht dem Volumen des größten der koinzidierenden Teilchen.

Sie entwickelten auf Grenzfall 2 aufbauend, den sie a priori für vorherrschend hielten, eine Korrekturmethode für den Koinzidenz-Zählverlust. Ihre Versuchsergebnisse sahen sie als Bestätigung des postulierten Koinzidenzverhaltens an. In einer Entgegnung machte KUBITSCHEK |34| die Autoren 1962 dann auf seine Theorie des Auflösungsverlustes aufmerksam, den er als Grund dafür ansieht, daß WALES und WILSON zu breite Verteilungen für Latex fanden und den Koinzidenz-Grenzfall 2 als überwiegend betrachteten. Die Autoren schließen sich zwar KUBITSCHEKS Meinung an |57|, betrachten ihre Koinzidenzkorrektur jedoch weiterhin als brauchbar zur Ermittlung der Teilchenkonzentration, bei der koinzidenzbedingte Zählverluste nicht mehr vernachlässigt werden können.

PRINCEN und KWOLEK |42,43| veröffentlichten 1965 bzw. 1966 verbesserte Koinzidenzkorrekturen für beide von WALES und WILSON angenommenen Grenzfälle. Während sie noch das Entstehen von Rechteckimpulsen zugrundelegten, zeigten GREGG und STEIDLEY |17| fast zur gleichen Zeit an Hand von Berechnungen und Modellversuchen im elektrolytischen Trog, daß beim Durchgang eines Teilchens durch die Bohrung ein fast sinusförmiger Impuls entsteht.

Die Korrekturmethoden der genannten Autoren, wie auch diejenigen von MATTERN |37| und MERCER |4o| haben den Nachteil, daß sie zwar den Zählverlust zu erfassen suchen, jedoch keine Korrektur der verzerrten Verteilung ermöglichen, die entsteht, wenn durch Koinzidenz zu große Impulse auftreten.

c) Über die positive Steigung in Rückstandssummenkurven haben SAMYN und McGEE |47| im Jahre 1965 berichtet. Sie führen diesen Effekt auf Grund ihrer Versuchsergebnisse mit einem Modell A auf einen Zählverlust zurück, der auftritt, wenn sehr große Teilchen neben kleinen Teilchen vorliegen. Die hohen Impulse der großen Teilchen sollen den Verstärker kurzzeitig blockieren, so daß kleine Teilchen während dieser Zeit nicht registriert werden können. Wenn auch die Relaxationszeit des Verstärkers bei schneller Impulsfolge berücksichtigt werden muß, stellt diese jedoch keine Erklärung dafür dar, daß bei niedrigem Schwellwert des Diskriminators weniger Impulse gezählt werden, als bei einem höheren Schwellwert. Dies bedeutet ja das Auftreten einer positiven Steigung in der Rückstandssummenkurve. Diese Erscheinung wird im folgenden als "McGEE-Effekt" bezeichnet.

Die genannten Fehlermöglichkeiten und ihre ungenügende Korrektur haben wohl EDMUNDSON |15| zu folgender Bemerkung veranlaßt:

> "Although simple in principle and reliable in operation, the Coulter Counter is a highly sophisticated apparatus, not to be regarded as a 'black box' that gives the right answer automatically."

EDMUNDSON |14,15| hat auch eine Korrekturmethode entwickelt, die alle beobachteten Phänomene zu erfassen scheint und dabei ohne aufwendige mathematische Behandlung auskommt. Bei der Anwendung des Verfahrens auf eigene Messungen wurden die Erwartungen zwar nicht erfüllt, dadurch aber die Klärung der Ursachen falscher Verteilungswiedergabe sehr gefördert.

5.4 Die Koinzidenzkorrektur nach EDMUNDSON Prinzip und Ergebnisse der Anwendung

Für die Entwicklung der Koinzidenzkorrektur-Methode von EDMUNDSON |14,15| sind die Überlegungen von PRINCEN und KWOLEK |43| bedeutsam, die daher im folgenden wiedergegeben werden.

Die Autoren gehen von der Existenz eines Impulsbildungsvolumens aus, das sich durch hohe Feldliniendichte auszeichnet. Bei der theoretischen Ableitung des Zusammenhanges von Teilchenvolumen und Widerstandsänderung ΔR wird dieses impulsbildende Volumen dem durch Querschnittsfläche und Länge der Bohrung definierten Volumen gleichgesetzt (Gleichungen (8) und (9), Abschnitt 2.3). Da außerhalb der Bohrung ebenfalls noch ein dichter Feldlinienverlauf vorhanden ist, wird das impulsbildende Volumen auch als größer angenommen |25,37|. Dafür sprechen auch die in Abschnitt 5.8 mitgeteilten eigenen Versuchsergebnisse.

In der Zeit T werden mit dem Meßvolumen V_m ml N Teilchen durch die Bohrung gesaugt. Ein Teilchen benötigt die Zeit t zum Passieren des Impulsbildungsvolumens A. Für t ergibt sich:

$$t = (A/V_m)\ T \quad .$$

Die Partikel folgen im zeitlichen Abstand t_i^+ aufeinander, der Mittelwert ist $\bar{t}^+$. Dann ist

$$T = \Sigma t_i^+ = N\ \bar{t}^+ \quad .$$

Aufgrund der zufälligen Verteilung der Teilchen ist der Anteil derjenigen Teilchen, die in kürzerem Abstand t_i^+ aufeinander folgen, als der Verweilzeit t im Impulsbildungsvolumen A entspricht, gleich $N\ t/2\bar{t}^+$. Bei diesem Anteil soll nur eines von zwei oder mehr Teilchen gezählt werden.

Der Verlust beträgt dann:

$$N\ t/2\bar{t}^{+} = N\ (A/V_m)\ T/2\bar{t}^{+}$$

$$= N\ (A/V_m)\ N\ \bar{t}^{+}/2\bar{t}^{+}$$

$$N\ t/2\bar{t}^{+} = N^2\ (A/2V_m) \qquad (16)$$

Gezählt werden nur

$$n = N\text{-}N^2\ (A/2V_m) = N\text{-}cN^2 \qquad (17)$$

Teilchen, wenn $A/2V_m = c$ gesetzt wird.

Da das Impulsbildungsvolumen A schwierig zu ermitteln ist, bestimmen PRINCEN und KWOLEK die Konstante c indirekt experimentell. Sie zählen bei verschiedenen relativen Konzentrationen x, tragen die Werte: Zählung/x über x auf und berechnen nach der Methode der kleinsten Quadrate $c = a/b^2$. Mit dieser Konstanten c ermitteln sie dann rechnerisch für jeden eingestellten Schwellwert die wahre Teilchenzahl N.

EDMUNDSON konnte aber zeigen, daß dieses c nicht für den ganzen Verteilungsbereich konstant ist. Dicht aufeinanderfolgende Teilchen führen nicht einfach zu einem Zählverlust, sondern auch zur Bildung von großen, zusätzlichen Impulsen. Bei niedrigen Schwellwerten werden dann weniger Teilchen gezählt, bei hohen Schwellwerten mehr, als der wahren Verteilung entspricht.

Zur Korrektur dieses Effektes hat EDMUNDSON |14| eine Extrapolationsmethode entwickelt. Er geht von Gleichung (17) aus:

$$n = N\text{-}cN^2 \ .$$

Für definierte Verdünnungen einer Suspension ist

$$N = k\ C \qquad (18)$$

C = relative Konzentration der Verdünnung.
Setzt man (18) in (17) ein und dividiert durch C, so erhält man:

$$n/C = -\ ck^2\ C + k \qquad ; \qquad (19)$$

n/C über C aufgetragen ergibt eine Gerade mit dem Achsenabschnitt k. Da $k = N/C$ ist, ist auch n/C bei Extrapolation

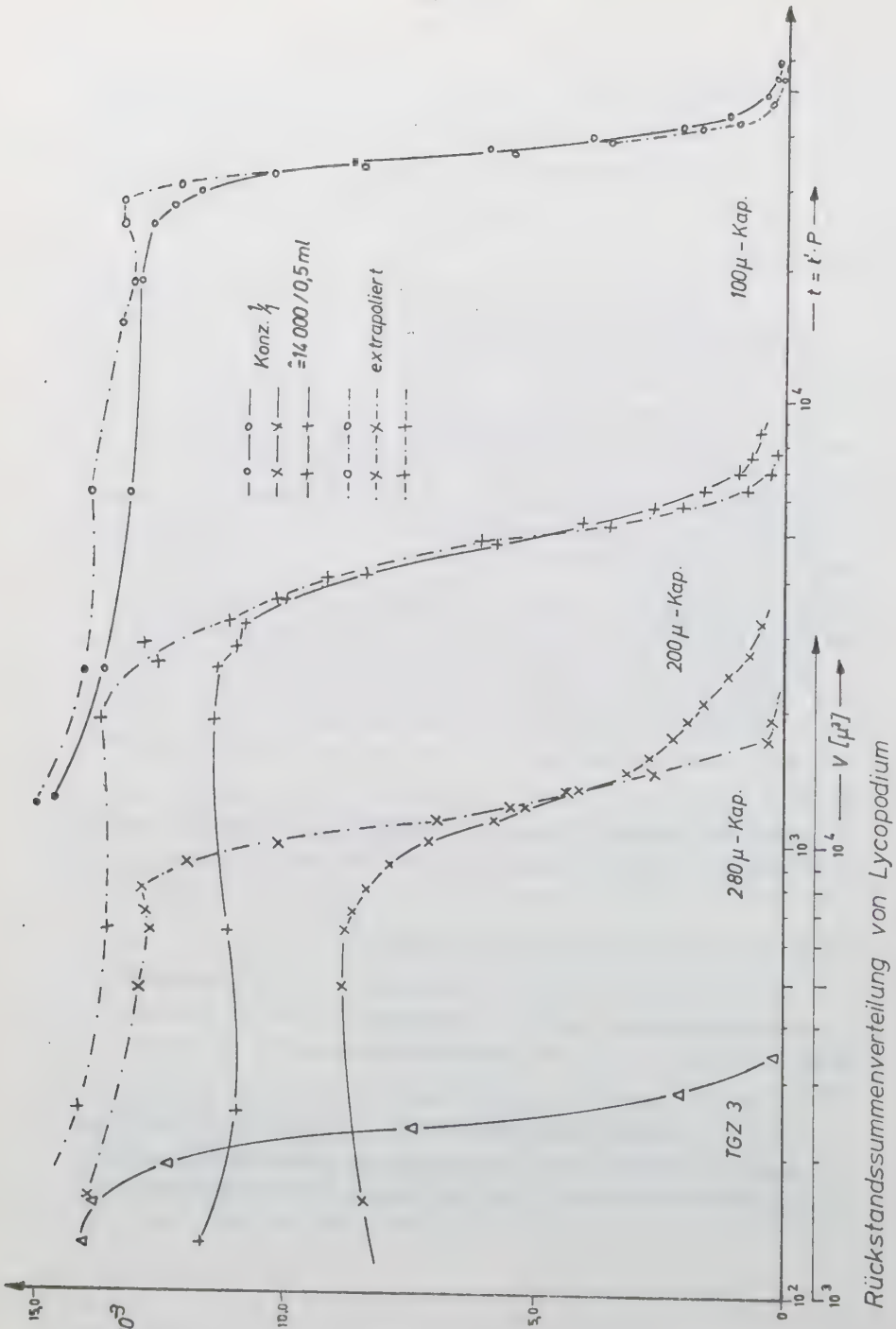


Abb. 7

Rückstandssummenverteilung von Lycopodium

auf die Konzentration 0 gleich N/C. Damit ist n = N, d.h. bei Extrapolation auf unendliche Verdünnung wird für jeden Schwellwert der gezählte Wert gleich dem richtigen Wert. Als Beleg für die Gültigkeit des Extrapolationsverfahrens zeigt EDMUNDSON Verteilungskurven von Lycopodium-Sporen.

Diese Extrapolationsmethode wurde auf Zählungen mit der 100, 200 und 280 µm-Kapillare angewendet. Besonders die Zählungen mit der 200 µm-Kapillare waren von Interesse, da deren Bohrung sich mit einem Winkel >90° erweitert und daher die effektive Bohrungslänge sehr gering ist. Dies bedeutet kurze Verweilzeit t der Teilchen und nach Gleichung (16) geringen Koinzidenzverlust. Ausgemessen wurden ebenfalls Lycopodium Sporen.

Die Teilchenkonzentration wurde mit $k = 1{,}4 \times 10^4$ Teilchen/0,5 ml sehr hoch gewählt. Gezählt wurde bei den relativen Konzentrationen C = 1/1, 1/2, 1/4.

In Abb. 7 sind eingetragen:

a) Die aus der mikroskopischen Ausmessung der Sporen berechnete Anzahl-Rückstandssummenkurve mit dem Volumen als Dispersitätsgröße;

b) Die mit den drei Kapillaren bei der rel. Konzentration 1/1 erhaltenen Rückstandssummenkurven mit dem erweiterten Schwellwert t als Dispersitätsgröße;

c) Die für die drei Kapillaren aus den extrapolierten Werten sich ergebenden Rückstandssummenkurven, ebenfalls mit dem erweiterten Schwellwert t als Dispersitätsgröße.

Beim Vergleich der Kurven sind zwei Erscheinungen überraschend:

1. Die extrapolierten Verteilungen der 200 und 280 µm-Kapillare stimmen nicht mit der berechneten, sowie der extrapolierten 100 µm-Kapillaren-Verteilung überein.

2. Bei der 200 µm-Kapillare ergibt die Extrapolation keine so starke Veränderung des Kurvenverlaufs wie bei der 280 µm-Kapillare, obwohl bei ihr ein ebenso deutlicher McGEE-Effekt auftritt wie bei der 280 µm-Kapillare.

Nach diesem Ergebnis kann das "N" der Extrapolationsformel nicht das wahre N der Teilchenverteilung beim Schwellwert t' sein. Damit ist aber auch die Anwendbarkeit der Beziehung (17) mit den gemachten Voraussetzungen in Frage gestellt, aus der die Extrapolationsformel hervorgeht.

Es ergeben sich zwei Fragen:

1. Wie wirkt sich das Passieren des Impulsbildungsvolumens A in kürzeren Zeitabständen aus, als der Passagezeit t entspricht? Kann gesagt werden, daß in diesem Fall überhaupt nur eines der Teilchen von z.B. zweien gezählt wird, oder eines mit doppeltem Volumen? Werden möglicherweise ein oder zwei Teilchen mit abweichenden Volumina registriert?

2. Wie ist das Impulsbildungsvolumen beschaffen?

Für die 200 µm-Kapillare kann wegen der äußerst geringen Bohrungslänge h kaum ein Impulsbildungsvolumen A = q h zutreffen (q = Querschnittsfläche der Bohrung).

Eine Beantwortung dieser Fragen wurde möglich mit den Ergebnissen der in den folgenden Abschnitten 5.5 mit 5.7 beschriebenen Überlegungen und Versuche.

5.5 Der Aussagewert der Extrapolationsmethode nach EDMUNDSON

Die Koinzidenzformel von PRINCEN und KWOLEK in der Form (16)

$$N\, t/2\bar{t}^{+} = N^2\, (A/2V_m) = cN^2 \qquad +)$$

macht zunächst nur eine Aussage darüber, welcher Anteil

+) N = Teilchenzahl im Meßvolumen V_m
A = Impulsbildungsvolumen
t = Zeitdauer der Passage von A
$\bar{t}^{+}$ = mittlerer zeitlicher Teilchenabstand

einer bestimmten Teilchenzahl in kürzeren Zeitabständen als t in dieses Volumen eintritt.

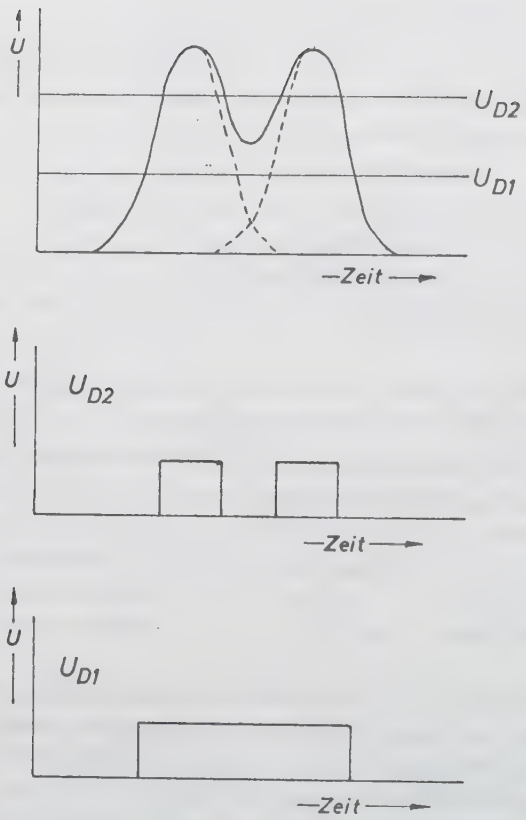
Wird bei einem solchen Eintritt nur ein Impuls registriert, ist die Summenzählung beim Schwellwert $t' < t'_{min}$ gleich $n = N-N\ t/2\bar{t}^{+}$. t'_{min} ist der dem kleinsten vorkommenden Teilchenvolumen entsprechende Schwellwert. Die Größe des Zählwertes n ist dann also nur bedingt durch die zeitliche Aufeinanderfolge der Teilchen.

Es ist aber durchaus möglich, daß Diskriminator und Zählwerk Impulse registrieren, die in kürzerem Abstand als t aufeinander folgen. Solche Impulse werden die Überlagerung zweier oder mehrerer Einzelimpulse darstellen und dementsprechend verändert sein.

Die Zählung solcher Impulse und die Deformierung sind in der Konstanten c der obigen Gleichung (16) nicht berücksichtigt.

Wenn man in diesem Fall bei einer Verdünnungsreihe auf unendliche Verdünnung extrapoliert, dann erhält man nicht N, den wahren Wert, sondern ein n_{∞}, das lediglich angibt, wie sich die bei der relativen Konzentration 1/1 bestimmte I m p u l s z a h l mit der Wahrscheinlichkeit $t/2\bar{t}^{+}$ bei fortschreitender Verdünnung nach ∞ verändert hat.

Diese Impulszahl ist die Summe aus der Menge normaler Impulse und der Menge von Koinzidenzimpulsen. Durch die Amplituden der Koinzidenzimpulse werden Teilchenvolumina definiert, die keinen reellen Teilchen der gemessenen Verteilung entsprechen. Bei Teilchen, die zu Koinzidenzimpulsen führen, bestimmt ihr zeitlicher Abstand die zeitliche Überlagerung der auftretenden Spannungsänderungen und die Amplitude des resultierenden Koinzidenzimpulses. Die Größe der zeitlichen Abstände ist zufällig verteilt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens sehr kurzer Zeitabstände zwischen zwei Teilchen verringert sich mit zunehmender Verdünnung der Teilchensuspension. Die Zahl der Koinzidenzimpulse wird kleiner. Bei der Extrapolation auf unendliche Verdünnung bleibt aber eine endlich



Überlagerungsimpuls und
Trigger-Impulse bei U_{D1} bzw. U_{D2}

Abb. 8

große Zahl von diesen Impulsen erhalten. Eine gewisse Korrektur ist nur für solche Koinzidenzimpulse möglich, die eine Folge der am wenigsten wahrscheinlichen Zeitabstände sind. Die geringste Wahrscheinlichkeit kommt dem Zeitabstand $t^+ = 0$ zu (d.h. zwei oder mehr Teilchen passieren die Bohrung in Kontakt miteinander). Die Impulsamplitude entspricht der Summe der Teilchenvolumina (Multipletimpuls). Die Korrektur der Anzahl von Multipletimpulsen ist aber von viel geringerer Bedeutung für die Verteilungswiedergabe als die nur unzureichend mögliche Korrektur der mit größerer Häufigkeit auftretenden übrigen Koinzidenzimpulse (Überlagerungsimpulse).

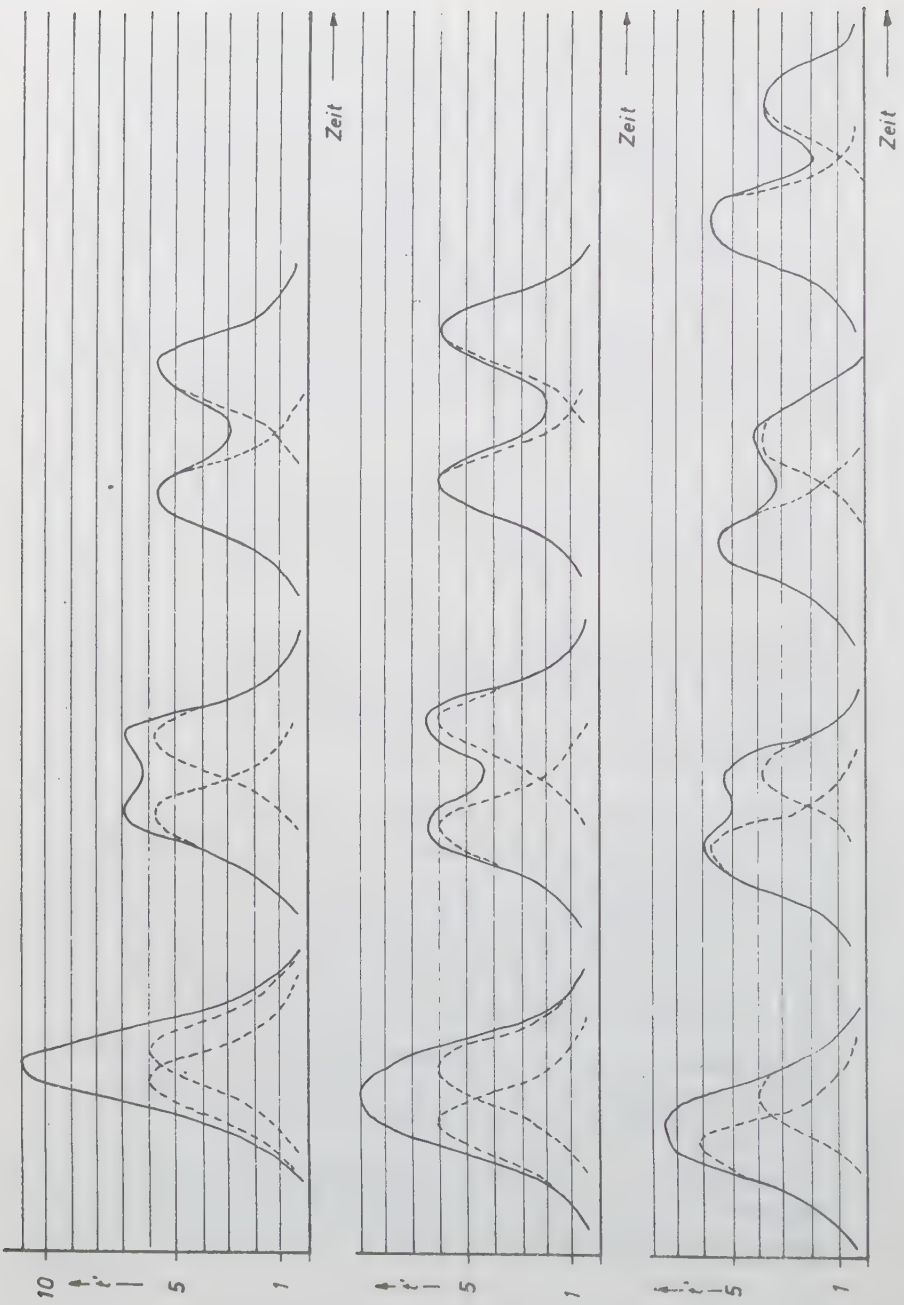
5.6 Erklärung des McGEE - Effektes durch das Vorkommen von Überlagerungsimpulsen

Das bereits geschilderte Auftreten von höheren Zählraten mit ansteigendem Schwellwert widerspricht zunächst jeder Logik. Es bietet sich jedoch eine Erklärung an, die auf dem Vorkommen von Überlagerungsimpulsen beruht.

Der Diskriminator (Schmitt-Trigger) mit dem unteren Schwellwert ("Lower Threshold") gibt immer dann einen Zählimpuls an das elektronische Zählwerk, wenn ein Teilchen-Spannungsimpuls in seinem ansteigenden Teil die mit dem Schwellwert t'eingestellte Diskriminatorspannung U_D übersteigt. Fällt die Impulsspannung unter eine gewisse Diskriminatorspannung $U_{D'}$ ab, ist der Impulsweg zum Zähler wieder blockiert.

Bei der Überlagerung zweier genügend breiter Spannungsimpulse entstehe ein Impuls der in Abb. 8 gezeigten Form ($U_{D'}$ ist gleich U_D gesetzt.).

Beim Schwellwert U_{D1} wird 1 Teilchen registriert werden, beim Schwellwert U_{D2} dagegen werden 2 Teilchen gezählt, da hier die Impulsspannung kurz unter U_{D2} absinkt und dann wieder ansteigt,



Überlagerungsimpulse für eine Modell-Verteilung

Abb. 9

ehe sie endgültig abfällt. Um welchen Betrag die Impulsspannung absinken muß, damit der Schmitt-Trigger schaltet, hängt von seinem Hysterese-Verhalten ab, d.h. von der Differenz $U_D - U_{D'}$ [54].

Das Ausmaß der zeitlichen Überlappung der Impulse und damit die Form des Überlagerungsimpulses ist zufällig verteilt. Die Wahrscheinlichkeiten für die Kombinationen kleiner und großer Impulse zu neuen Impulsen entsprechen den Häufigkeiten der entsprechenden Teilchen in der Verteilung selbst.

Die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten der Impulse führt zu einer Verzerrung der Verteilungskurven nach rechts und zu dem McGEE-Effekt.

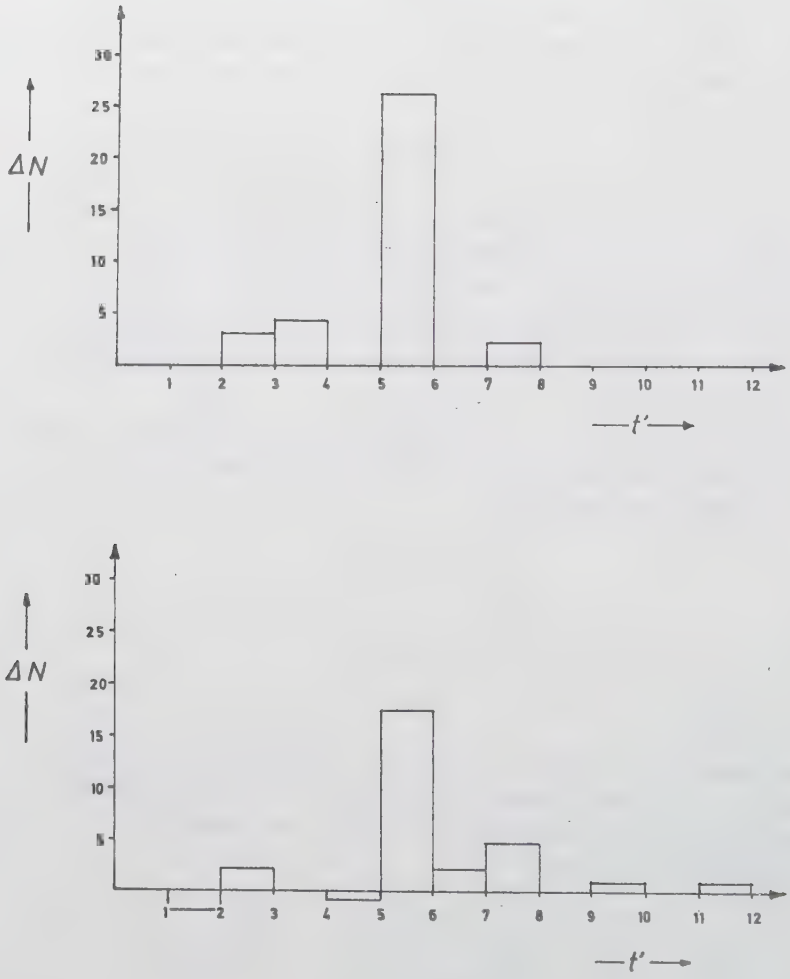
Dies kann an einer einfachen Modell-Verteilung gezeigt werden. Eine Verteilung gebe theoretisch folgende Summenzählungen mit steigendem Schwellwert t':

t'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11	12
N	35	35	32	28	28	2	2	o				
ΔN		o	3	4	o	26	o	2				

Überlappen bei dieser Verteilung 1o Impulse der Klasse 5-6 und 4 Impulse der Klasse 3-4 mit verschiedenen zeitlichen Abständen (Abb.9), so erhält man folgende Summen- und Häufigkeitsverteilung:

t'	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1o	11	12
N	25	27	25	25	26	9	7	2	2	1	1	o
ΔN		-2	+2	o	-1	+17	+2	+5	o	1	o	1

Die Häufigkeitskurven der beiden Verteilungen zeigen die Veränderung noch deutlicher (Abb.1o).



Veränderung einer Modell-Dichteverteilung durch Überlagerungsimpulse.

Abb. 10

Ein sehr ähnliches Bild wird erhalten, wenn man die mit der 280 µm-Kapillare bestimmte Häufigkeitsverteilung mit der Lycopodium-Verteilung vergleicht, die mit der nur wenig verzerrenden 100 µm-Kapillare erhalten wurde (Abb. 11).

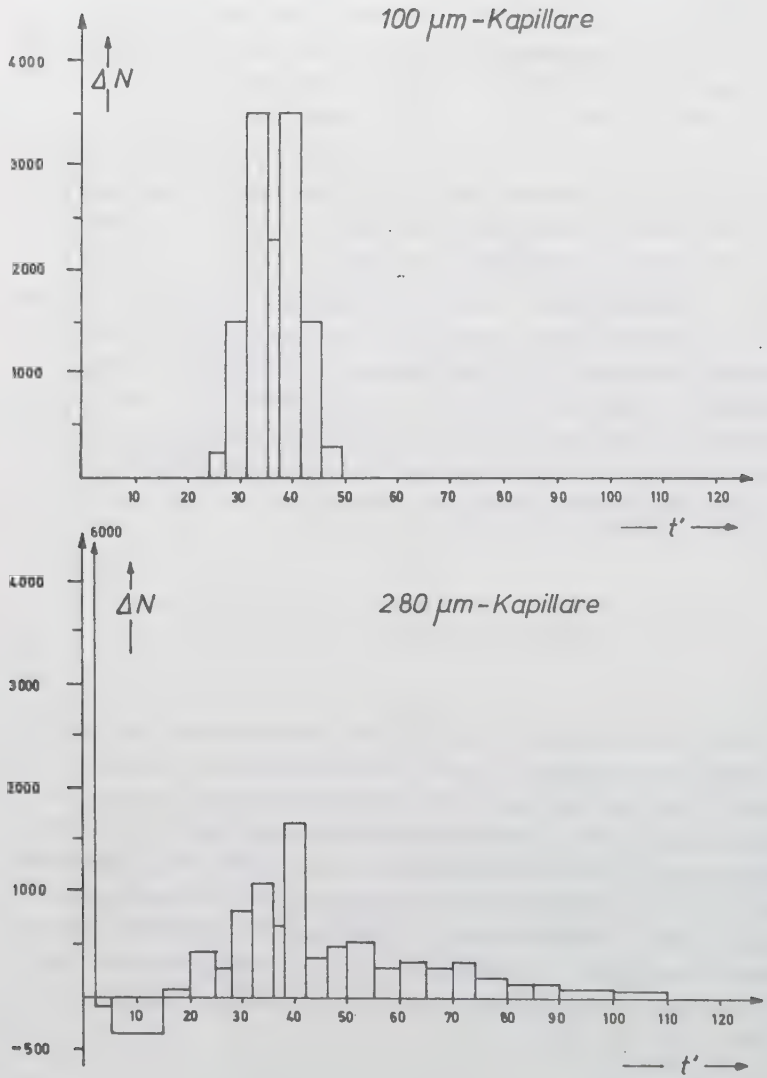
Die Verteilung der Häufigkeits-Differenzen zwischen den gemessenen bzw. extrapolierten Werten der 280 µm-Kapillare und den Werten der wenig verzerrten Verteilung zeigt, daß die Extrapolations-Korrektur ungenügend ist (Abb. 12).

Das Häufigkeitsmaximum links vom Lycopodium-Maximum in der Verteilung in Abb. 11 unten stammt von den bereits erwähnten zu kleinen Impulsen. Die Überlagerung von Impulsen in der geschilderten Weise führt ja nur zu nach rechts gestreckten Verteilungen. Zur Bestätigung der Richtigkeit dieser Überlegungen wurden Impulsdauer und -form bei den einzelnen Kapillaren mit Hilfe eines Oszillographen untersucht [+].

5.7 Oszillographische Untersuchung der Impulse

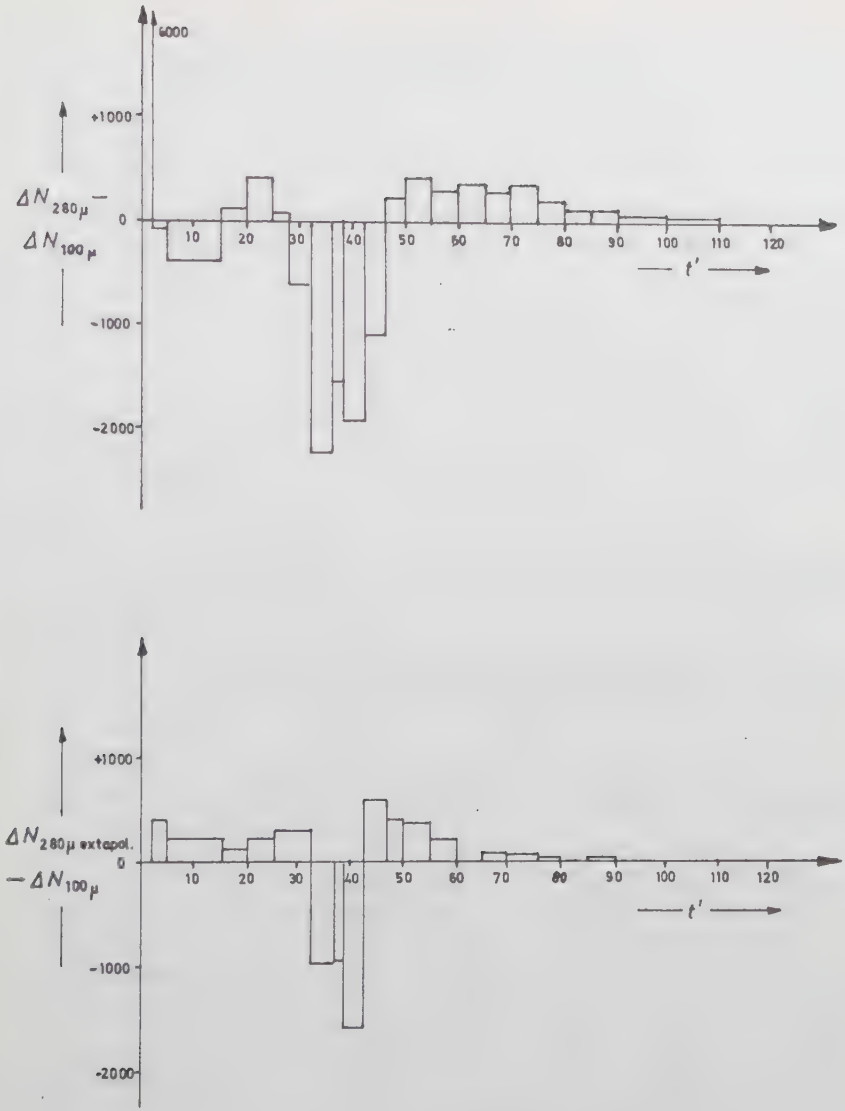
Die nicht zu verändernde horizontale Zeitablenkung (sec/cm) des im Coulter Counter eingebauten Oszillographen ist so eingestellt, daß die Impulse als senkrechte Striche unterschiedlicher Höhe auf dem Leuchtschirm erscheinen. Zur Prüfung der Impulsform war es daher notwendig, einen Labor-Oszillographen am Ausgang des regelbaren Vorverstärkers ("High Sensitivity-Pre-Amplifier") anzuschließen. An diesem Gerät konnte die Zeitablenkung so gewählt werden, daß sich die Impulsform gut beobachten ließ. Ausgewertet wurden Photographien der Impulsbilder.

[+] Ich danke Herrn Dipl.Phys. Brix vom Physikal. Institut der Universität Würzburg für die Durchführung des Versuchs.



Dichteverteilung von Lycopodium bestimmt mit 100µm bzw. 280 µm-Kapillare.

Abb. 11



Verteilungsdichte der Differenzen

zwischen $\Delta N_{100\mu}$ *und* $\Delta N_{280\mu}$ *bzw.* $\Delta N_{280\mu\ extrapol.}$

Abb. 12

Tabelle 8: Impulsdauer bei verschiedenen Kapillaren und Substanzen.

	Latex		Lycopodium		Quarz	
Kap.	IHB µsec	IBB µsec	IHB µsec	IBB µsec	IHB µsec	IBB µsec
70	5	16	-	-	5	12-16
100	5	12-16	7-9	16	6	16
200	8	16	8	16	8	16
280 µm	16	26	12	24	-	25

IHB = Impuls-Halbwerts-Breite
IBB = Impuls-Basis-Breite

Tabelle 9: Impulsdauer bei zwei Strömungsgeschwindigkeiten für Latex.

Geschw.	6 m/sec		3 m/sec	
Kap.	IHB µsec	IBB µsec	IHB µsec	IBB µsec
70	5	16	8	22
100	5	12-16	8-10	25
200	8	16	8	20-40
280 µm	16	26	20	40

IHB = Impuls-Halbwerts-Breite
IBB = Impuls-Basis-Breite

5.7.1 Messung der Impulsdauer

Die Messungen sollten Aufschlüsse liefern über eventuelle Abhängigkeiten der Impulsdauer von den Variablen:

a) Bohrungsdurchmesser (und -länge im Hinblick auf die sehr kurze Bohrung der 200 µm-Kapillare);

b) Strömungsgeschwindigkeit der Suspension (6 m/sec bzw.3 m/sec);

c) Art der zu zählenden Teilchen (Latex, Lycopodium und Quarz).

Die Ergebnisse der an den Impulsbildern vorgenommenen Messungen sind in den Tabellen 8 und 9 zusammengestellt.

Typische Impulsbilder, wie sie mit der 70, 100 und 200 µm-Kapillare erhalten wurden, zeigen die Abb. 13-15.

Vergleicht man die Impulslängen mit den Verweilzeiten eines Teilchens im Bohrungsvolumen, die sich aus den in der Tabelle 10 aufgeführten Dimensionen der Bohrungen und der Strömungsgeschwindigkeit errechnen, so fällt auf, daß die Impulsdauer größer als die Verweilzeit und dabei relativ unabhängig von dieser ist.

Die Verdoppelung der Verweilzeit bei Erniedrigung der Strömungsgeschwindigkeit auf die Hälfte wirkt sich nicht proportional auf die Impulsdauer aus.

Bei der 280 µm-Kapillare mit einer Verweilzeit von 18 µsec bei halber Strömungsgeschwindigkeit weisen die Impulse bei nicht meßbar veränderter Impulshöhe ein Plateau auf. (Die Eichfaktorbestimmung zeigt eine Impulshöhenabnahme von 6 % an, siehe Abschnitt 4.5 .)

Diese Ergebnisse bedeuten für das Modell B:

a) Die Impulsdauer wird erst in zweiter Linie von der Verweilzeit des Teilchens im Bohrungsvolumen bestimmt.

b) Die Verweilzeit beeinflusst die Impulshöhe nur geringfügig.

c) Teilchenart und -gestalt haben keinen Einfluß auf die Impulsdauer.

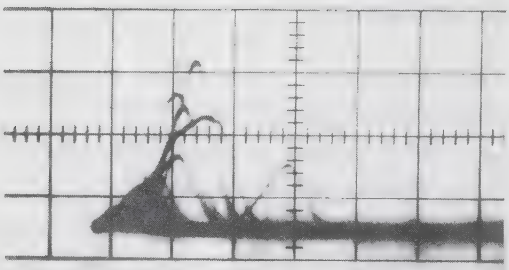


Abb. 13
Impulsbild 70 µm-K.
Quarz 20-30 µm
x: 10 µsec/cm
y: 50 mV/cm

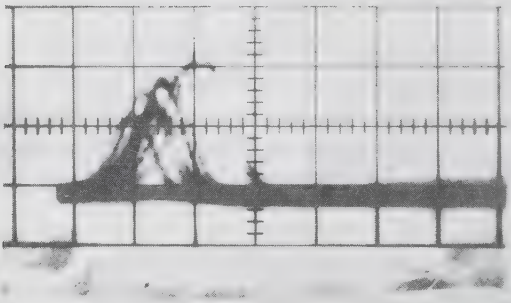


Abb. 14
Impulsbild 100 µm-K.
Lycopodium Sporen
x: 10 µsec/cm
y: 20 mV/cm

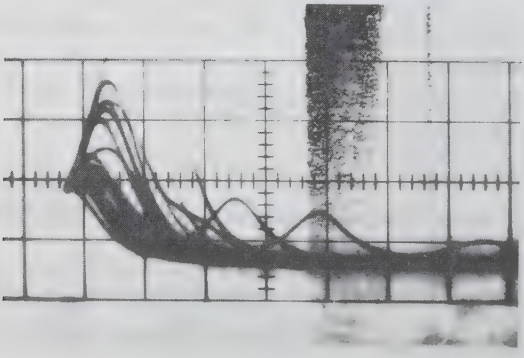


Abb. 15
Impulsbild 200 µm-K.
Lycopodium Sporen
x: 10 µsec/cm
y: 50 mV/cm

Der Impulsverlauf wird demnach beim Modell B im wesentlichen von den Zeitkonstanten $\tau = R\,C$ des Verstärker-Eingangskreises und des Meßwandlers (Kapillare mit Elektroden) festgelegt, bei dem die Elektroden- und Kapillarkapazität und der Elektrolyt- bzw. Kapillarwiderstand eingehen.

Tabelle 10: Bohrungsdimensionen, Strömungs- und Durchflußgeschwindigkeiten sowie Verweilzeiten im Bohrungsvolumen.

D_n µm	D_g µm	q mm^2	h µm	t_D sec	v_S m/sec	v_D ml/sec	t µsec
30	30	$7{,}06 \times 10^{-4}$	15	127,0	5,56	$3{,}94 \times 10^{-3}$	2,7
50	66	$3{,}42 \times 10^{-3}$	15	27,2	5,38	$18{,}37 \times 10^{-3}$	2,7
70	70	$3{,}85 \times 10^{-3}$	20	25,0	5,20	$20{,}0 \times 10^{-3}$	3,6
100	90	$6{,}36 \times 10^{-3}$	30	13,0	6,06	$38{,}4 \times 10^{-3}$	5,4
200	185	$2{,}96 \times 10^{-2}$	5	3,3	5,64	$151{,}5 \times 10^{-3}$	0,85
280	266	$5{,}55 \times 10^{-2}$	50	1,6	5,63	$313{,}0 \times 10^{-3}$	9,0

D_n = nomineller Bohrungsdurchmesser
D_g = gemessener Bohrungsdurchmesser
q = Querschnittsfläche
h = geschätzte Bohrungslänge
t_D = Durchlaufzeit für 0,5 ml Suspension
v_S = Strömungsgeschwindigkeit
v_D = Durchflußgeschwindigkeit
t = Verweilzeit eines Teilchens im Bohrungsvolumen

Überlagerungsimpulse

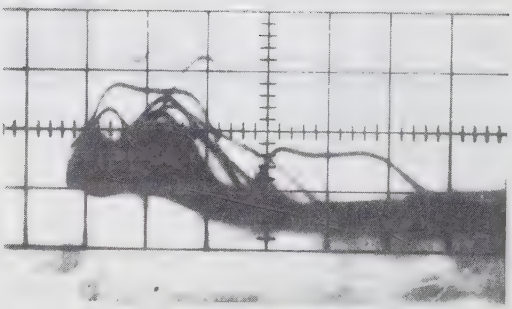


Abb. 16 280 µm-Kap. Quarz 20-30 µm
(x: 10 sec/cm ; y: 20 mV/cm)

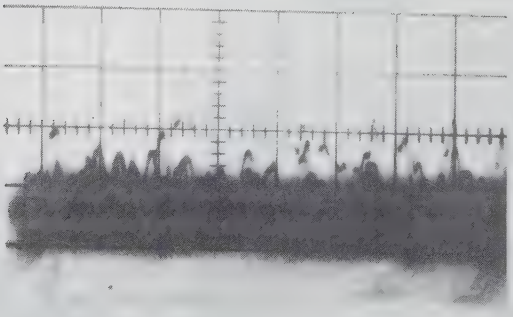


Abb. 17 280 µm-Kap. Quarz 20-30 µm
(x: 100 sec/cm ; y: 20 mV/cm)

5.7.2 Überlagerungsimpulse

Die zur Erklärung des McGEE-Effektes herangezogenen Überlagerungsimpulse konnten bei der 280 µm-Kapillare sehr häufig beobachtet werden (Abb. 16,17). Bei den beim Photographieren notwendigen niedrigen Teilchenkonzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit für das photographische Festhalten von Überlagerungsimpulsen bei den drei weiteren untersuchten Kapillaren so gering, daß sehr viele Aufnahmen hätten gemacht werden müssen, um auf wenigstens einem Bild einen Überlagerungsimpuls zu finden. Auf dem Oszillographenschirm konnten solche Impulse jedoch gesehen werden.

Die in Abschnitt 5.4 gestellten Fragen nach der Auswirkung der zeitlichen Aufeinanderfolge der Teilchen in der Bohrung auf die Verteilungswiedergabe sowie nach der Beschaffenheit des Impulsbildungsvolumens lassen sich wie folgt beantworten:

1. Die RC-Glieder des Meßstands und des Verstärkers deformieren die von Teilchen in der Bohrung erzeugten Impulse. In Abhängigkeit von der sich ständig ändernden Teilchenfolge-Frequenz entstehen durch die Wirkung der RC-Glieder Impulse, deren Amplitude im geforderten bzw. unerwünschten Grenzfall dem Volumen eines bzw. mehrerer Teilchen proportional ist, oder - ebenfalls unerwünscht - Impulse, die als Überlagerung von Einzelimpulsen verzerrt sind.

Durch den Schmitt-Trigger werden aus diesen Impulsen Zählimpulsfolgen gebildet, die repräsentativ für die Teilchenvolumenhäufigkeit sein sollen. Sie sind dies jedoch nur, wenn sie aus einer Impulsfolge entstanden sind, deren Impulszahl gleich der Teilchenzahl ist und deren Impulsamplituden dem Teilchenvolumen streng proportional sind.

2. Das Impulsbildungsvolumen und die Verweilzeit eines Teilchens darin sind nicht allein die bestimmenden Größen für den Anteil koinzidierender Teilchen einer gegebenen Teilchenzahl.

(2.) Wichtig ist auch der von den Zeitkonstanten der RC-Glieder geprägte Impulsverlauf. Die offen bleibende Frage nach der Beschaffenheit des Impulsbildungsvolumens muß in diesem Sinne neu gestellt werden.

Ebenso müssen die auf falschen Voraussetzungen aufgebauten Koinzidenzkorrektur-Ansätze überarbeitet werden, wobei die Teilchenfolgefrequenz-Verteilung, die Teilchenimpulsdauer, sowie deren Veränderung durch die RC-Glieder als bestimmende Größen zu betrachten sind. Solche verbesserten Koinzidenzkorrekturen werden aber auch nur dann anwendbar sein, wenn sich die im folgenden beschriebene Ursache für die Entstehung zu kleiner Impulse beseitigen läßt.

5.8. Die Entstehung zu kleiner Impulse bei Bohrungen verschiedenen Durchmessers

Da sich beim Modell B der Eichfaktor K_V nur bei der 200 und 280 µm-Kapillare mit der Strömungsgeschwindigkeit geringfügig ändert (Abschnitt 4.5), wobei sich an der Häufigkeitsverteilung nichts ändert, kann die von KUBITSCHEK |33,34| für das Modell A gegebene Erklärung des Auftretens zu kleiner Impulse für das Modell B nicht übernommen werden (siehe Abschnitt 5.3 a)).

Die Ursache dieser Fehlzählungen konnte mit Hilfe folgender Beobachtung aufgeklärt werden:

Hat sich nach einer längeren Meßreihe in einer anschließenden Pause ein Teilchensediment am Boden des Kapillarraumes angesammelt, so wird bei der ersten Messung nach dieser Pause das Sediment durch den in die Kapillare eintretenden Flüssigkeitsstrahl aufgewirbelt. Ist ein niedriger Schwellwert eingestellt, erhält man bei dieser ersten Messung einen viel

höheren Zählwert, als bei den anschließenden Messungen bei gleichem Schwellwert. Die Zählung wird erst reproduzierbar, wenn die aufgewirbelten Teilchen mit der Flüssigkeit weggetragen worden sind.

Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Vermutung, daß Teilchen auch außerhalb der Bohrung Impulse erzeugen können. Zu ihrer Bestätigung diente der folgende Versuch: Die 280 µm-Kapillare wurde mit einer Teilchensuspension gefüllt und bei der Messung teilchenfreier Elektrolyt durch die Bohrung gesaugt. Obwohl keine Teilchen die Bohrung passierten, traten Impulse auf.

Damit ist erwiesen, daß auch außerhalb der Bohrung die elektrische Feldliniendichte durch Teilchen so stark geändert werden kann, daß ein Impuls auftritt.

Die direkte quantitative Erfassung dieser Impulse ist schwierig, da der in die Kapillare einströmende Elektrolyt die Teilchenkonzentration kontinuierlich erniedrigt.

Zwei wichtige qualitative Aussagen lassen sich jedoch machen:
1. Die von Teilchen außerhalb der Bohrung erzeugten Impulse haben kleinere Amplituden als die von denselben Teilchen in der Bohrung hervorgerufenen Impulse.

2. Mit zunehmendem Bohrungsdurchmesser erhöht sich bei konstanter Teilchenkonzentration in der Kapillare die Zahl der Fehlimpulse.

Diese Ergebnisse decken sich mit den bei normalen Verteilungsmessungen mit verschiedenen Kapillaren gemachten Erfahrungen bezüglich des Vorkommens zu kleiner Impulse. Das Auftreten von Fehlimpulsen ist demnach nicht an das Vorhandensein einer erhöhten Teilchenkonzentration in der Kapillare gebunden.

Der Befund ist so zu deuten, daß im Inneren der Kapillare, also auf der Austrittsseite des durch die Bohrung einströmenden Flüssigkeitsstrahles, Wirbel auftreten, die mitgeführte Teilchen in die außerhalb des Bohrungsvolumens vorhandene Zone hoher Feldliniendichte tragen.

Abb. 18: Ausbildung von Stromfäden mit abnehmender Druckdifferenz in der 200 µm-Kapillare

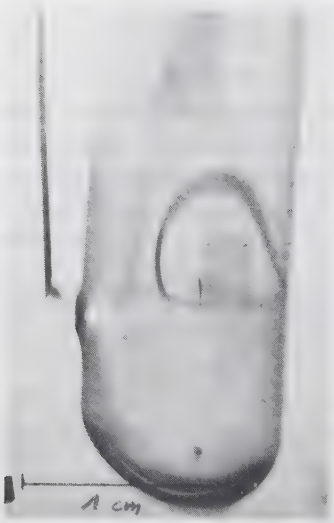


Abb. 18 a

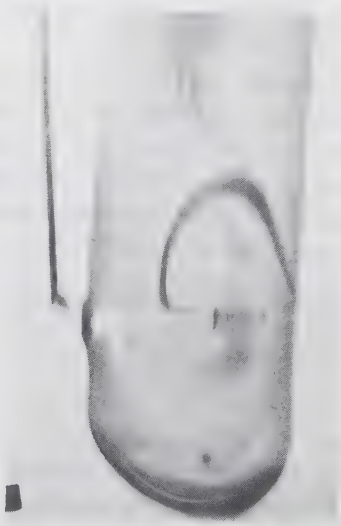


Abb. 18 b

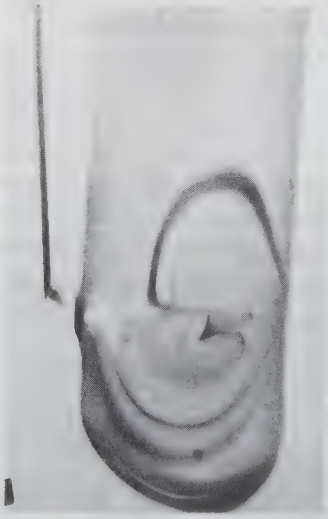


Abb. 18 c

Bei Strömungen, die durch geringe Druckdifferenzen von ca. 5 cm Wassersäule (WS) hervorgerufen wurden, konnte die Entstehung der Wirbel durch Zufließenlassen eines dünnen Tusche-Strahles sichtbar gemacht werden (Abb. 18 a-c).

Die Tusche-Teilchen werden in Zonen geringer Flüssigkeitsbewegung abgelagert und bilden dort gut sichtbare Stromfäden aus. Am Verlauf dieser Stromfäden läßt sich erkennen, daß der durch die Bohrung in den Kapillarraum eintretende Flüssigkeitsstrahl senkrecht zu seiner Achse eine konzentrische Strömung erzeugt. Weiterhin besteht eine radial auf die Bohrung zu gerichtete Strömung.

Der entstehende Flüssigkeits-Strömungskörper kann als Rotationsellipsoid beschrieben werden, dessen kleine Achse mit der Bohrungsachse zusammenfällt.

Bei größeren Druckdifferenzen als 5 cm WS und entsprechend höheren Strömungsgeschwindigkeiten lassen sich die Stromfäden nicht mehr erkennen; statt ihrer tritt ein dunkel gefärbter Bereich auf (Abb. 19).

Die Radialströmung führt die Teilchen sehr nahe an die Bohrung heran; von dort aus werden sie vom eintretenden Flüssigkeitsstrahl zum Inneren der Kapillare hin mitgerissen.

Wie Abb. 20 zeigt, ist der gleiche Strömungskörper auch bei der 100 µm-Kapillare vorhanden. Es treten jedoch nur wenig Fehlimpulse auf.

Für die Entstehung zu kleiner Impulse kommt es sowohl auf den Feldlinienverlauf außerhalb des Bohrungsvolumens bei den einzelnen Kapillaren an, als auch auf die Strömungsverhältnisse in und unmittelbar außerhalb der Bohrung. Hier können Modellversuche eine Klärung bringen, die auch zur Konstruktion von verbesserten Kapillaren nötig sind, bei denen die Wirbelbildung nicht zu Fehlzählungen führt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Arbeit von BUNGAY [7]. Der Autor erhielt unterschiedliche Teilchengrößenverteilungen in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit in

Abb. 19
Strömungskörper
in der 200 µm-Kap.
bei hoher Durchfluß-
geschwindigkeit

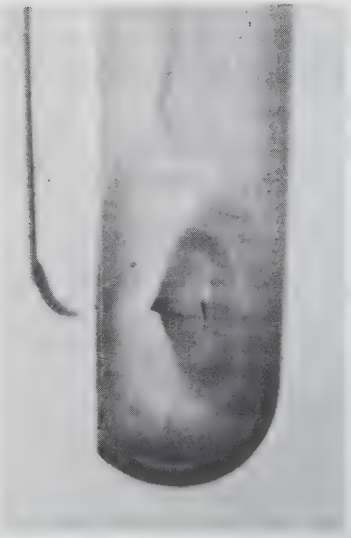


Abb. 20
Stromfäden in der
100 µm-Kap.

der Suspension. Er führt dies "auf eine durch Wandeffekte bewirkte Teilchenbewegung im Geschwindigkeitsfeld nahe der Bohrung" zurück. Es ist also möglich, daß bei ungünstigen Strömungsverhältnissen auch außerhalb der Kapillare durch Teilchen undefinierte Impulse erzeugt werden.

Um zu prüfen, ob der McGEE-Effekt nicht einfach darauf beruht, daß im Verlauf einer Meßreihe die Teilchenkonzentration infolge Teilchensedimentation in den Bohrungsraum der Kapillare ansteigt und dadurch höhere Zählungen auftreten, wurde bei einer Messung mit der 280 µm-Kapillare nach jeder einzelnen Zählung bei dem gerade eingestellten Schwellwert der Kapillarraum gespült. Der McGEE-Effekt blieb dabei genau so reproduzierbar wie bei einer längeren Meßreihe, bei der zwischen jeder Zählung 1 min gewartet wurde, um eine Sedimentation der Teilchen zu fördern.

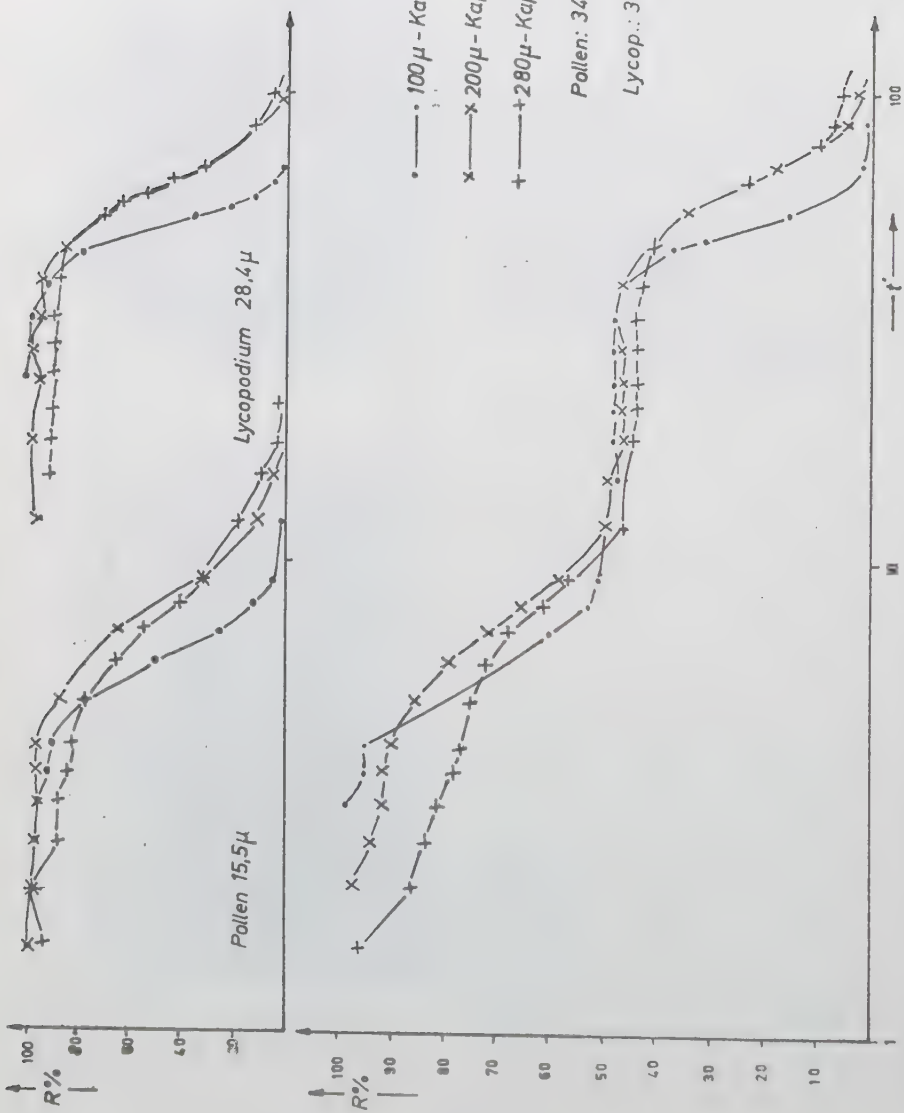


Abb. 21

Rückstandssummenverteilung von Pollen 15,5µ, Lycopodium bzw. Pollen mit Lycopodium.

6. AUSWIRKUNGEN DES AUFTRETENS ZU KLEINER IMPULSE

Durch die Aufklärung der Ursachen falscher Verteilungswiedergabe hat sich ergeben, daß die in der Literatur (Abschnitt 5.3 b)) angegebenen Methoden zur Korrektur der Verfälschung nicht befriedigen, da sie auf falschen Voraussetzungen aufbauen. Auch wird sich eine Verbesserung der Verteilungswiedergabe letztlich nur durch technische Veränderungen des Meßwandlers und Meßverstärkers erreichen lassen, die weiterführende Untersuchungen erfordern.

Unter den gegenwärtigen Umständen müssen daher Einschränkungen der Verwendbarkeit des Gerätes zu Teilchengrößenanalysen vorgenommen werden. Dabei ist die in Abschnitt 5.8 beschriebene Erzeugung von nach Zahl und Größe nicht definierten, zu kleinen Impulsen von besonderer Bedeutung.

6.1 Die Wiedergabe breiter Verteilungen mit Kapillaren verschiedener Bohrungsdurchmesser

Liefert eine Kapillare sehr viele Fehlimpulse, ist eine genaue Messung breiter Verteilungen nicht möglich.
Dies zeigt eine Versuchsreihe mit der 100, 200 und 280 µm-Kapillare, bei der Nettle Pollen und Lycopodium Sporen zunächst für sich allein und dann zusammen gemessen und gezählt wurden (Abb. 21).

Bereits bei den getrennten Bestimmungen der Rückstandssummenverteilungen für Pollen und Lycopodium sind bei der 200 und 280 µm-Kapillare die Kurven durch zu kleine Impulse verfälscht. Die erhöhte Teilchenkonzentration bei vereinigten Substanzen läßt die Zahl der Fehlimpulse so stark ansteigen, daß vor allem bei der 280 µm-Kapillare die wahre Teilchengrößenverteilung des Pollens nicht mehr erkannt werden kann.

In einem weiteren Versuch mit der 100 und 280 µm-Kapillare wurde Nettle Pollen zusammen mit zwei verschiedenen Teilchenkonzentra-

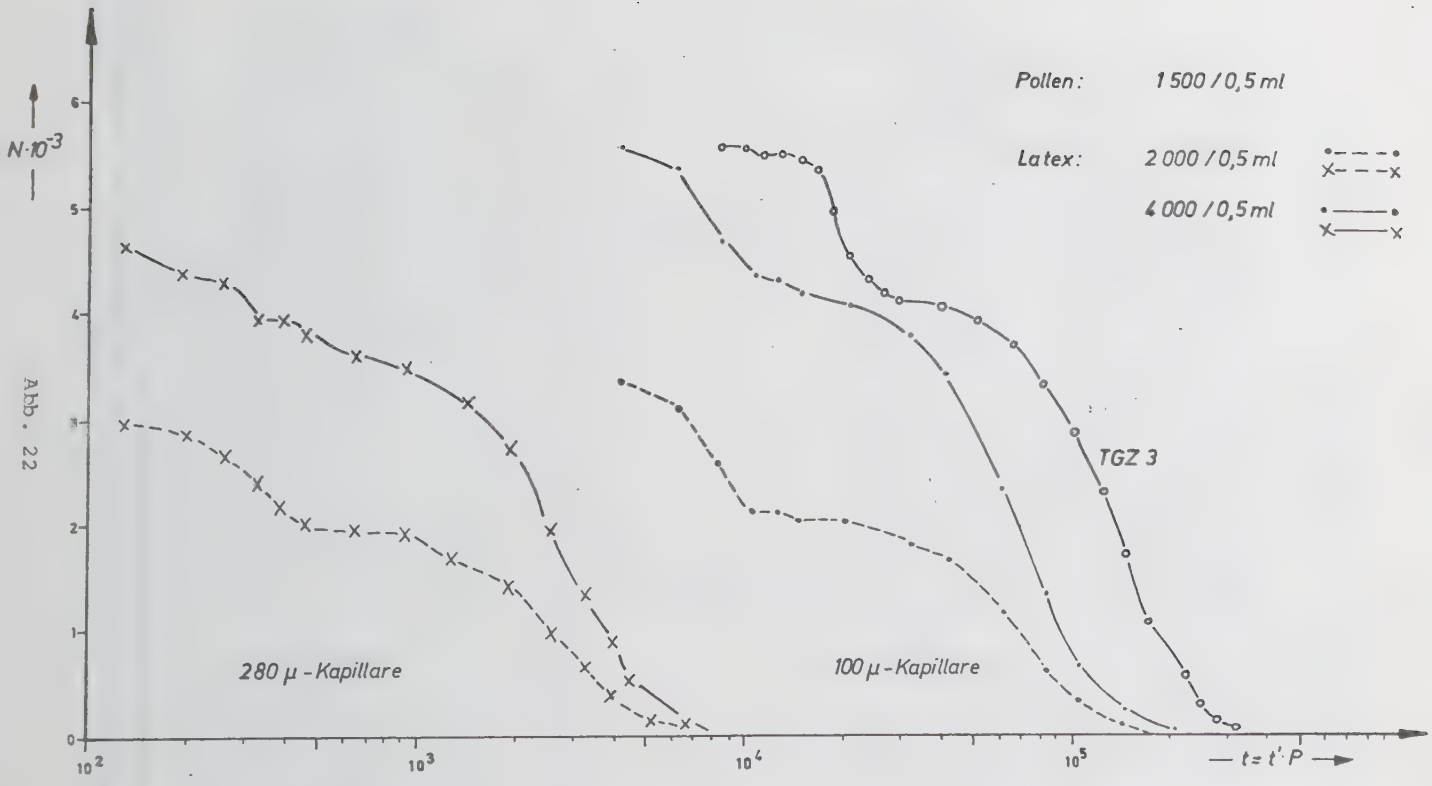


Abb. 22

Rückstandssummenverteilung von Pollen 15,8µ mit Latex 29,3µ bei zwei Latex-Konzentrationen.

tionen von Latex 29,3 µm ausgemessen. Die Kurven in Abb. 22 lassen beim Vergleich mit der TGZ 3 -Kurve wiederum die Konzentrationsabhängigkeit der Verfälschung durch zu kleine Impulse erkennen.

Ferner wurde eine Quarzsand-Fraktion von 20-30 µm Sieb-Korngröße mit der 70, 100, 200 und 280 µm-Kapillare ausgemessen. Auch hier ist eine Veränderung der Verteilung in Abhängigkeit vom Bohrungsdurchmesser zu erkennen (Abb. 23).

6.2 Die Anwendbarkeit der Volumen-Eichmethode

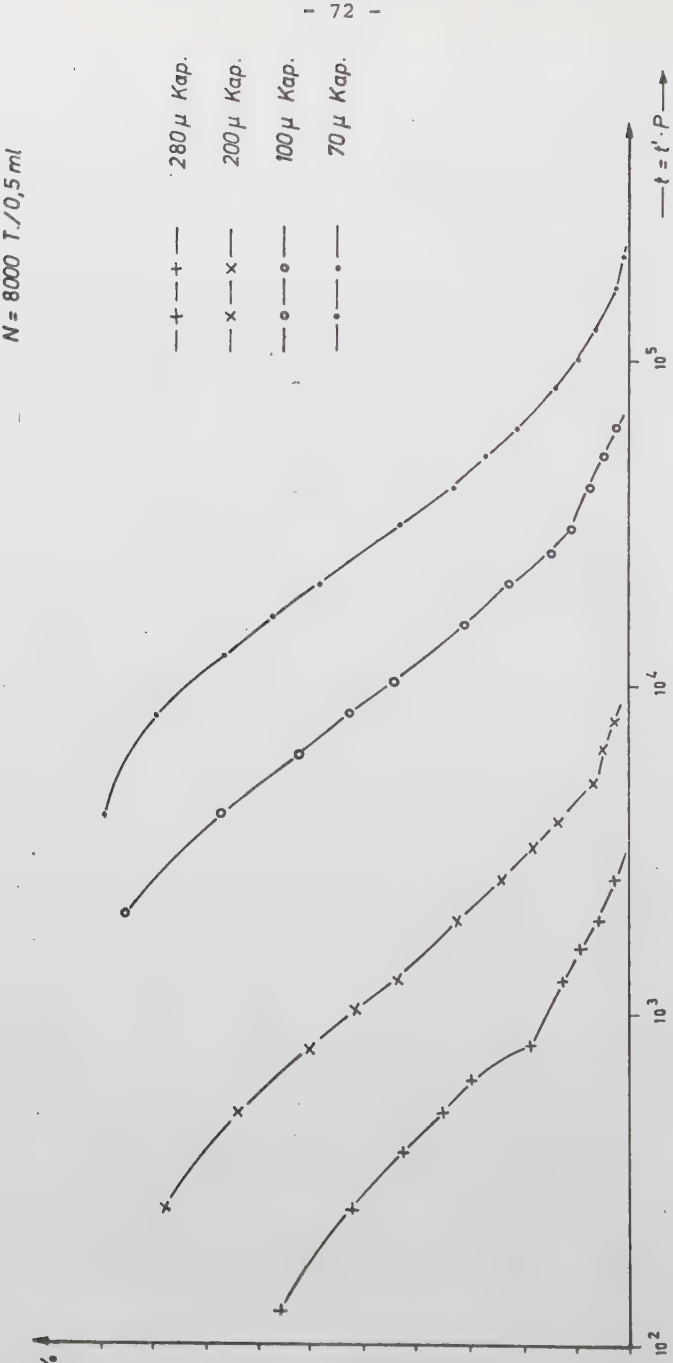
Mit kugelförmigen Teilchen kann der Eichfaktor K_V für eine Kapillare durch Kurvenvergleich ermittelt werden (Methode 2, Abschnitt 3.1). Bei niedrigen Teilchenkonzentrationen wird K_V auch für stark verfälschende Kapillaren noch genau.

Dagegen läßt sich bei unregelmäßigen Teilchen nur die Volumen-Eichmethode (Methode 1, Abschnitt 3.1) anwenden.

Die Entstehung zu kleiner Impulse bei einer Kapillare führt dabei aber zu einem Fehler in K_V. Welche Ausmaße dieser Fehler annehmen kann, zeigen Berechnungen von Volumen-Eichfaktoren aus den Bestimmungen von Nettle Pollen-Verteilungen bei gleicher Impulsfolgefrequenz (Abschnitt 4.4) und aus den Bestimmungen von Lycopodium-Verteilungen (Abschnitt 5.4) mit und ohne Extrapolationskorrektur.

In Tabelle 11 sind diese Volumen-Eichfaktoren ($K_V(1)$) zusammen mit den Kurvenvergleichs-Eichfaktoren ($K_V(2)$) aufgeführt. Der auf $K_V(2)$ bezogene relative Fehler von $K_V(1)$ wächst für die Nettle-Pollen-Bestimmung bis auf 9,6 % bei der 280 µm-Kapillare an, für die Lycopodium-Bestimmung sogar auf 22,8 % infolge der starken Verfälschung bei hoher Teilchenkonzentration.

Die Volumen-Eichmethode läßt sich also nur dann anwenden, wenn feststeht, daß bei der verwendeten Kapillare kaum Fehlzählungen auftreten.



Rückstandssummenverteilung von Quarz 20-30 µm bei versch. Kapillaren

Abb. 23

Tabelle 11: Vergleich der nach Eichmethode 1 und 2 erhaltenen Eichfaktoren.

1. Nettle Pollen Impulsfrequenz $\bar{f}$ = 1250 G.Tr.: 100

Kap.	$K_V(1)$	$K_V(2)$	x_1 %	V mit $K_V(1)$ μ^3	T./0,5 ml
70	0,078	0,081	- 3,7	$3,53 \times 10^6$	$2,87 \times 10^4$
100	0,228	0,240	- 5,0	$3,53 \times 10^6$	$1,74 \times 10^4$
200	1,50	1,59	- 5,6	$3,62 \times 10^6$	$4,1 \times 10^3$
280µm	5,10	5,64	- 9,6	$3,57 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$

x_1 = relativer Fehler von $K_V(1)$, bezogen auf $K_V(2)$

2. Lycopodium Sporen Teilchenkonz.: $1,4 \times 10^4$ T./0,5 ml G.Tr.:30

Kap.	$K_V(1)$ norm.	$K_V(1)$ extr.	$K_V(2)$	x_1 %	V mit $K_V(1)$ norm. μ^3	V mit $K_V(1)$ extr. μ^3
100	0,432	0,473	0,414	+ 4,3	$1,75 \times 10^8$	$1,94 \times 10^8$
200	2,40	3,38	2,50	- 4,0	$1,39 \times 10^8$	$2,08 \times 10^8$
280µm	8,00	13,86	10,36	-22,8	$1,03 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$

x_1 = relativer Fehler von $K_V(1)$ normal, bezogen auf $K_V(2)$

6.3 Gültigkeit von Verteilungs-Extrapolationen

Von verschiedenen Autoren |22,23,48,49,51| sind Verfahren zur numerischen oder graphischen Verteilungskurven-Extrapolation entwickelt worden, mit dem Ziel, den vom Coulter Counter nicht erfaßten Feinanteil einer Verteilung bestimmen zu können. Es leuchtet unmittelbar ein, daß durch das Auftreten zu kleiner Impulse in Abhängigkeit von der Teilchenkonzentration und der verwendeten Kapillare diese Extrapolationsverfahren zu falschen Verteilungsparametern führen können. Ebenso problematisch ist die vorgeschlagene Berechnung des nicht erfaßten Massen-Feinanteils |21|.

Zur Ermittlung dieses Anteils ermittelt man aus dem Eichfaktor K_V, den mittleren erweiterten Klassenschwellwerten $\bar{t}_i$ und der Klassenhäufigkeit Δn_i das Gesamtvolumen V der gezählten Teilchen im Meßvolumen der Suspension:

$$V = \Sigma_i \bar{t}_i \Delta n_i K_V \qquad (20)$$

Nach Multiplikation mit der Teilchendichte erhält man den erfaßten Massenanteil. Die Differenz zur Masseneinwaage im Meßvolumen wird dann Teilchengrößen unterhalb der Meßgrenze zugeordnet. In Tabelle 11 sind die nach obiger Formel (20) berechneten Volumina für Nettle Pollen-†) und Lycopodium-Bestimmungen mit verschiedenen Kapillaren aufgeführt.

Während die Volumenwerte bei niedrigen Teilchenkonzentrationen für alle Kapillaren übereinstimmen, ergeben sich bei hohen Teilchenzahlen im Meßvolumen sehr große Differenzen zwischen den Werten der einzelnen Kapillaren.

Nach dem Kurvenverlauf in Abb. 7 kann die mit der 100 µm-Kapillare gemessene Lycopodium-Verteilung als die genaueste angesehen werden. Vergleicht man die berechneten Volumina der 200 und 280 µm-Kapillarenbestimmung mit dem Volumenwert der

---

†) Die Volumina wurden für gleiche Teilchenkonzentration von 1800 T. / 0,5 ml berechnet.

100 µm-Kapillare und betrachtet die Differenzen als Feinanteil-Volumen, erhält man erstens einen nicht vorhandenen Feinanteil und zweitens zwei verschiedene Werte für diesen.

Wurde zur Bestimmung des Eichfaktors K_V (l) eine Kurven-Korrektur nach EDMUNDSON |14| vorgenommen, wird der Eichfaktor K_V(l) zu groß. Berechnet man mit diesem Eichfaktor das Volumen aus der extrapolierten Verteilung, tritt das Paradoxon auf, daß der vom Coulter Counter erfaßte Massenanteil größer ist, als die Masseneinwaage betragen hat.

Die Voraussetzungen zur Anwendung solcher Verteilungsextrapolationen sind im Augenblick also noch nicht hinreichend erfüllt.

7. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Fügt man die vorangehend dargelegten Untersuchungsergebnisse in eine Beschreibung des Meßprinzips ein, ergibt sich folgendes:

Die aus den Teilchen und der Elektrolytlösung bestehende Suspension strömt durch eine Kapillarbohrung, in der ein dichtes elektrisches Feld vorliegt. Passiert ein Teilchen dieses Feld, tritt an den Elektroden eine momentane Potentialänderung ein, deren Ausmaß bestimmt wird von Größe, Form und Natur der Teilchen (siehe Abschn. 4.2), vom Bohrungsdurchmesser (4.3) und von der Elektrolytleitfähigkeit (4.6). Die Amplitude und Dauer des im Meßverstärker verstärkten Impulses werden bestimmt durch die RC-Glieder sowohl des Meßwandlers (Kapillare, Elektrolyt und Elektroden) als auch des Meßverstärkers (5.7.1).

Der funktionale Zusammenhang zwischen dem interessierenden Teilchenvolumen und der als Meßgröße dienenden Impulsamplitude ist noch nicht in allen notwendigen Einzelheiten bekannt (2.3). Man ist daher bei der praktischen Arbeit mit dem Gerät auf eine Eichung angewiesen. Die Messungen sind also nur relativ genau, mit Bezug auf die verwendete Eichsubstanz. Mit steigender Teilchenfolgefrequenz, bedingt durch hohe Teilchenkonzentration der Suspension und große Durchflußgeschwindigkeit (ml/sec) bei weiten Kapillarbohrungen, treten vermehrt Überlagerungen von Impulsen auf (5.7.2). Die Amplituden dieser Koinzidenzimpulse sind nicht mehr eindeutig dem Teilchenvolumen zugeordnet (5.2).

Haben die Teilchen die Kapillarbohrung passiert, wird ein Teil von ihnen durch Strömungen in der Kapillare dicht an die Bohrung herangetragen. Die Teilchen durchqueren das dort herrschende starke elektrische Feld und erzeugen weitere, nach Zahl und Größe nicht von der Teilchenverteilung her definierte Impulse. Die Amplituden dieser Fehlimpulse sind niedriger als die Amplituden der von denselben Teilchen in der Bohrung erzeugten normalen Impulse. Bei den untersuchten weitlumigen Kapillarbohrungen

ist die Zahl der Fehlimpulse besonders groß (5.8). Bei der 28o µm-Kapillare treten darüberhinaus auch sehr viele Überlagerungsimpulse auf (siehe Abb. 16 und 17). Es wird daher vermutet, daß die Fehlimpulse zur Entstehung jener Impulse wesentlich beitragen.

Sowohl die normalen, von Teilchen in der Bohrung erzeugten Impulse als auch die Koinzidenzimpulse und die von Teilchen außerhalb der Bohrung hervorgerufenen Fehlimpulse werden nach ihrer Verstärkung dem Diskriminator zugeführt. Der Diskriminator setzt die Teilchenimpulse in Zählimpulse um, sofern die Spannungsamplitude der Teilchenimpulse die eingestellte Diskriminatorspannung übersteigt (5.6).

Aus den Diskriminator-Schwellwerten, die ein Maß für die Diskriminatorspannung sind, und den zugeordneten Zählungen werden mittels des Eichfaktors K_V Werte der Dispersitätsgröße und die Verteilungsdichte der gemessenen Teilchen erhalten. Die registrierten Koinzidenzimpulse und zusätzlich durch Teilchen erzeugten Fehlimpulse führen dabei zu Verfälschungen der Dichteverteilungen.

Die Untersuchungen zeigen also, daß die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Verteilungswiedergabe bei verschiedenen Kapillaren untereinander eine Folge von Fehlern ist, die durch die Konstruktion des Meßwandlers und wohl auch die Auslegung des Vorverstärkers bedingt sind. Hieraus ergeben sich folgende Einschränkungen der Verwendbarkeit des Coulter Counters zu Teilchengrößenanalysen und der Anwendbarkeit von üblichen Koinzidenzkorrekturen bzw. Verteilungsextrapolationsmethoden:

1. Die große Zahl von Fehlimpulsen bei Kapillaren mit einem Bohrungsdurchmesser von 2oo und 28o µm erlaubt keine genaue Wiedergabe von Verteilungen selbst bei niedrigen Teilchenkonzentrationen. Damit sind Verteilungen, die Teilchen mit einem Durchmesser bis zu 8o µm und größer enthalten, vorläufig nicht auszumessen. Bei welchem Teilchendurchmesser die obere Meßbereichsgrenze des Coulter Counters gezogen werden muß, hängt

von der Zahl der Fehlimpulse bei Kapillaren mit Bohrungsdurchmessern zwischen 100 und 200 µm ab. Die untersuchte 100 µm-Kapillare liefert noch brauchbare Meßergebnisse, d.h. Teilchen bis zu 40 µm Durchmesser können gemessen werden. Kapillaren mit Bohrungen zwischen den Größen 100 und 200 µm standen für eine Überprüfung der Verteilungsverfälschung nicht zur Verfügung. Die Untersuchung solcher Kapillaren wird zeigen, wie weit über 40 µm Teilchendurchmesser hinausgegangen werden kann.

2. In der Literatur wird die Meinung vertreten |9,58|, daß breite Verteilungen vom Coulter Counter genauer wiedergegeben werden als enge. Dies kann richtig sein, solange nur Teilchenkoinzidenzen als Ursache von Verteilungsverfälschungen angenommen werden. Demgegenüber muß aber festgestellt werden, daß sich die Entstehung von Fehlimpulsen besonders stark bei breiten Verteilungen auswirkt (6.1). Am genauesten lassen sich enge Normal- oder log. Normalverteilungen messen. Hält sich die Zahl der Fehlimpulse in Grenzen, können die Verteilungsparameter auch bei Teilchenkonzentrationen $>10^4$ T./0,5 ml noch genügend genau ermittelt werden. Bei hohem Fehlimpulsanteil ändert sich dagegen die Verteilungsfunktion mit der Teilchenkonzentration (6.1, Abb. 22). Die Verteilung wird breiter wiedergegeben.

3. Es gibt bis jetzt noch keine brauchbare Korrekturmethode, die eine Elimination des Fehlimpulsanteils ermöglicht (5.3 b), 5.5). Aussagekräftige Meßergebnisse können daher nur mit solchen Kapillaren erhalten werden, die wenig Fehlimpulse liefern. Solange einwandfreie Meßwandler nicht zur Verfügung stehen, muß man sich durch Messungen mit mehreren Kapillaren und Vergleich der erhaltenen Dichteverteilungen mit einer mikroskopisch bestimmten eine Kenntnis der Wiedergabegüte der Meßwandler verschaffen. Die Notwendigkeit solcher Vergleiche auch bei englumigen Kapillarbohrungen kann durch eine Arbeit von COOPER |9| demonstriert werden. Der Autor erhielt mit mehreren Kapillaren von nominell 30 µm Bohrungsdurchmesser unterschiedliche Verteilungswiedergaben.

4. Selbst bei exakter Wiedergabe der Verteilungsdichte einer Substanz durch eine Kapillare bleibt die Messung mit einem systematischen Fehler behaftet, und zwar hinsichtlich des Wertes der Dispersitätsgröße. Die Impulsamplitude scheint nicht allein eine Funktion des Teilchenvolumens zu sein, sondern auch anderer Teilcheneigenschaften (4.2). Der Eichfaktor K_V wird dadurch zu einer Relativgröße, mit Bezug auf die Eichsubstanz. Durch Anwendung der Volumen-Eichmethode (3.1) wird versucht, einen Absolutwert für K_V zu erhalten. Sobald aber die Verteilungsdichte nicht exakt wiedergegeben wird, ist dieser Versuch sinnlos (6.2).

5. Sehr kritisch müssen in diesem Zusammenhang auch die Extrapolationsmethoden zur rechnerischen oder graphischen Ermittlung des vom Meßwandler nicht erfaßten Feinanteils einer Substanz geprüft werden, da für diese Verfahren entweder die Verteilungsdichte allein oder das mit ihrer Hilfe und K_V berechnete Absolutvolumen benötigt werden. Aus den Berechnungen in Abschnitt 6.2 läßt sich entnehmen, welche großen Fehler auftreten können, wenn mit fehlimpuls-liefernden Kapillaren gearbeitet wird. Die Abhängigkeit des Eichfaktors von Substanz- und Gerätvariablen ist hierbei noch nicht berücksichtigt.

Der Coulter Counter ist also bei Verwendung geeigneter Kapillaren und dem Arbeiten mit Teilchenkonzentrationen, die weit unter den bis jetzt üblichen liegen, brauchbar zur schnellen Bestimmung relativer Teilchengrößenänderungen innerhalb enger Verteilungen. Am genauesten können dabei solche Verteilungen gemessen werden, deren Parameter sich durch mikroskopische Teilchenanalyse ermitteln lassen, also Verteilungen kugelförmiger Teilchen, wie z.B. Emulsionskügelchen.

Damit die vom Gerät prinzipiell gebotenen Möglichkeiten in der bereits praktizierten Weise (siehe Anhang) bei ausreichender Meßgenauigkeit voll ausgenutzt werden können, sind eine Reihe weiterer Untersuchungen mit dem Ziel von Verbesserungen

notwendig. Einmal ist die Abhängigkeit der Impulsamplitude und -dauer von den RC-Gliedern des Eingangsverstärkers zu bestimmen, sowie von den RC-Gliedern des Meßwandlers, damit den Impulsen eine größere Flankensteilheit gegeben werden kann. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Überlagerungsimpulsen wird dadurch verringert. HARVEY |24| hat gezeigt, daß bei elektronischer Differentiation, anschließender Integration und erneuter Differentiation der Impulse die Verteilungswiedergabe verbessert werden kann.
Der ordnende Effekt der Kapillarbohrung wird nach SPIELMAN |50| größer und damit die Koinzidenzwahrscheinlichkeit kleiner bei Austritt der Teilchensuspension aus einer Düse vor der Kapillarbohrung. Auf dem Weg zur Bohrung wird der Teilchenstrom durch die Radialströmung zur Bohrung hin fokussiert und dadurch der Anteil nebeneinander statt hintereinander in die Bohrung eintretender Teilchen verringert. Besonders für weitlumige Bohrungen kann das Verfahren empfehlenswert sein. Allerdings ist die Teilchenkonzentration nicht mehr eindeutig definiert, da die Ausströmgeschwindigkeit der Suspension aus der Düse nicht konstant ist. Die Volumen-Eichmethode läßt sich dann nicht anwenden.

Zum anderen sind Kenntnisse über die Abhängigkeit der Impulsamplitude von Teilcheneigenschaften wie: Form, Oberflächenbeschaffenheit, Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante zu erlangen, damit absolute Volumen-Eichfaktoren eingeführt werden können. Solche Untersuchungen setzen verbesserte Kapillaren voraus, die strömungstechnisch so durchkonstruiert sind, daß die Wirbelbildung hinter der Bohrung nicht zur Entstehung von Fehlimpulsen führt.
Wenn dadurch die Verteilungsdichte für verschiedene Kapillarbohrungen reproduzierbar wird, können sowohl breite Verteilungen bestimmt werden, als auch Messungen mit solchen Kapillaren aneinander angeschlossen werden. Diese Möglichkeit mußte bei den beabsichtigten Untersuchungen der Teilchengrößenveränderung beim Tablettieren bestehen, da beim Tablettenzerfall ein sehr weites Teilchengrößenspektrum auftritt. Sie ist

jedoch noch nicht gegeben.
Die Reproduzierbarkeit der fehlerbehafteten Meßergebnisse ist gut, wie die Bestimmung von Eichfaktoren in Abhängigkeit von den Gerät-Einstellgrößen (Abschn. 4.1) gezeigt hat.

B. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Bei der Eichung eines Coulter Counters Modell B für Kapillaren mit den Bohrungsdurchmessern: 3o, 7o, 1oo, 2oo und 28o µm wurden für die Eichsubstanzen: Pupp-Ball Sporen, Nettle Pollen, Lycopodium Sporen und Latex jeweils unterschiedliche Teilchengrößenverteilungen erhalten. Die Verteilungskurven stimmten besonders bei der 2oo und 28o µm-Kapillare nur annähernd mit den bei mikroskopischer Messung erhaltenen Verteilungen überein.

2. Die elektrischen Einstellgrößen des Gerätes haben keinen Einfluß auf die Verteilungswiedergabe. Die Reproduzierbarkeit der vom Gerät gelieferten Verteilungskurven ist gut.

3. Die Eichfaktoren sind zwar proportional zu D^4 (D = Bohrungsdurchmesser), jedoch ergeben sich für die 3o µm-Kapillare, die 7o und 1oo µm-Kapillare bzw. die 2oo und 28o µm-Kapillare verschiedene Proportionalitätsfaktoren. Diese sind unabhängig vom Verhältnis Teilchendurchmesser zu Bohrungsdurchmesser.
Bei gegebenem Bohrungsdurchmesser führt beim Modell B eine Erhöhung der Elektrolytleitfähigkeit zu einer Abnahme des Eichfaktors, die in Widerspruch steht zu den theoretischen Ableitungen für die Beziehung zwischen Teilchenvolumen und Widerstandsänderung.

4. Beim Modell B ist die Amplitude der auftretenden Spannungsimpulse nur bei der 2oo und der 28o µm-Kapillare abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit der Teilchensuspension. Bei deren Erniedrigung auf die Hälfte nimmt die Impulsamplitude bei beiden Kapillaren um 6 % ab. Die Impulshalbwertsbreite nimmt hierbei zwar zu, jedoch nicht bis zum doppelten Wert. Impulsform und -dauer sind relativ unabhängig von Länge und Durchmesser der Bohrung. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die Zeitkonstanten des Meßstandkreises und der Verstärker-

kreise

den Impulsverlauf stärker bestimmen als die Verweilzeit eines Teilchens im dichten elektrischen Feld in der Bohrung.

5. Die Eichfaktoren sind abhängig von der Art der Eichsubstanz. Ob dies eine Folge der elektrischen Eigenschaften der Teilchen ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

6. Die Veränderung von Verteilungskurven hat drei Ursachen:

a) Dicht aufeinander folgende Teilchen erzeugen einen einzigen Impuls, dessen Höhe der Summe der Teilchenvolumina entsprechen kann. Der entstehende Zählverlust ist relativ gering, ebenso die Verfälschung der Verteilungskurve durch diese Art der Koinzidenz.
b) Je nach zeitlichem Abstand der die Bohrung passierenden Teilchen entstehen Überlagerungsimpulse mit zwei oder mehr Amplitudenmaxima. Werden diese Maxima vom Diskriminator getrennt registriert, tritt die von SAMYN und McGEE |47| beschriebene positive Steigung in Rückstandssummenkurven auf. Es muß angenommen werden, daß an der Ausbildung von Überlagerungsimpulsen auch Fehlimpulse beteiligt sind (siehe c)).
c) Zusätzliche, kleinere Fehlimpulse können durch Teilchen, die bereits die Bohrung passiert haben, im Inneren der Kapillare hervorgerufen werden. Diese Fehlimpulse entstehen, wenn im Kapillarraum außerhalb der Bohrung noch ein Bereich hoher elektrischer Feldstärke vorliegt und Teilchen durch Flüssigkeitswirbel in diesen Bereich getragen werden. Der Durchgang der Teilchen durch das elektrische Feld führt zu meßbaren Potentialänderungen an den Elektroden, d.h. zu den Fehlimpulsen. Die Zahl dieser Fehlimpulse wächst mit der Teilchenkonzentration der Suspension und dem Bohrungsdurchmesser der Kapillare. Durch die Registrierung der Fehlimpulse ergeben sich starke Kurvenverfälschungen besonders bei breiten Teilchenverteilungen. Mit einer 2oo und einer 28o µm-Kapillare konnten breite Verteilungen wegen der hohen Fehlimpulszahl nicht mehr gemessen werden.

7. Die von EDMUNDSON |14,15| entwickelte Koinzidenzkorrektur-Methode reicht nur aus zur teilweisen Elimination der unter 6. a) dieser Zusammenfassung genannten Summenimpulse. Die theoretischen Überlegungen, die zu der Methode geführt haben, sind nicht richtig.

8. Bei Kapillaren mit starker Fehlimpulsbildung ist die Volumen-Eichmethode nicht anwendbar. Eine Extrapolation der Verteilungskurve über die untere Meßgrenze der Kapillare hinaus zur Bestimmung des nicht erfaßten Feinanteils einer Substanz führt dann ebenfalls zu falschen Werten.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Ausrüstung zur Teilchengrößenbestimmung mit dem Coulter Counter

1.1 Coulter Counter Modell B mit Rührer.

Hersteller: Coulter Electronics Ltd.
Dunstable/Bedfordshire
Großbritannien

Die Messungen wurden ohne Verwendung des zum Gerät gehörenden Schreibers (Plotter) durchgeführt.

1.2 Kapillaren.

Die 30, 50, 70, 100 und 280 µm-Kapillare wurden mit dem Coulter Counter geliefert.
Die 200 µm-Kapillare mit einer sich nach innen mit einem Winkel $>90^{\circ}$ erweiternden Bohrung wurde bezogen von der Firma

Dr. W. und H. Göhde
Münster.

1.3 Magnetventil mit Impulspausensteuerung.

Zum Einschalten des Elektrodenstromes wird zunächst durch Öffnen eines Hahnes zur Vakuumpumpe ein Quecksilbermanometer aus der Gleichgewichtslage gebracht. Der Quecksilberfaden wird dabei hinter zwei in das Manometer eingeschmolzene Kontaktdrähte zurückgezogen. Dann wird durch den Polungsschalter der Strom eingeschaltet. Beim Schließen des Vakuumhahnes steigt das Quecksilber im einen Manometerschenkel wieder, schaltet bei Berührung des ersten Kontaktdrahtes das Zählwerk ein und bei Berührung des

zweiten wieder aus, ebenso den Elektrodenstrom. Das Manometervolumen zwischen den Kontaktdrähten beträgt o,5 ml. Da beim Vorrücken der Quecksilbersäule ein entsprechendes Suspensionsvolumen die Bohrung passiert, ermöglicht diese Vorrichtung das Zählen der in o,5 ml Suspensionsvolumen vorhandenen Teilchen.

Zur Messung bei konstanter Spannung (siehe Abschn. 4.1.2) und zur Arbeitserleichterung wurde der Vakuumhahn ersetzt durch ein Magnetventil, das von einer Impulspausensteuerung geschaltet wird. Diese Steuerung ermöglicht das Anlegen des Vakuums über das Magnetventil in kontinuierlich einstellbaren Zeitabständen von o-3oo sec für eine ebenfalls kontinuierlich wählbare Zeitdauer von o-1o sec. Die Schaltpausen richten sich nach den Durchflußzeiten für o,5 ml Suspension bei den verwendeten Kapillaren. Die Einschaltdauer wurde nach den Ergebnissen der Spannung-über-Zeit-Messung zu 1o sec festgelegt.

Magnetventil:

3-Wege-2-Stellungs-(3/2)-Magnetventil der Firma LUCIFER Genf
Kat. Nr. 131 A o4 für 22o V 5o Hz.

Der nicht benötigte Anschluß O des Ventils wurde mit einem Gummistopfen verschlossen.

Impulspausensteuerung:

1 Verzögerungsschaltwerk Typ VS 3oo sec
1 Verzögerungsschaltwerk Typ VS 1o sec
für 22o V 5o Hz in Einbaugehäuseausführung PL 125

Hersteller: Ernst Tesch KG
Wuppertal-Vohwinkel

1 Schaltschütz Siemens K 915 III-O 1 Ö

Die Verdrahtung wurde nach dem von der Fa. Tesch zur Verfügung gestellten Schaltplan VB 2418 vorgenommen.

1.4 Regelung der Suspensions-Strömungsgeschwindigkeit.

Die unter 4.5 beschriebenen Versuche bei halber Strömungsgeschwindigkeit erforderten das Anlegen eines Gegendruckes an das Quecksilbermanometer des Meßstandes. Dazu wurde das offene Ende des Manometers über eine Sicherheitsflasche und ein Kontrollmanometer im Nebenschluß mit dem Reduzierventil einer Preßluftflasche verbunden. Der Gegendruck wurde auf 100±5 mm Hg einreguliert.

2. Elektrische Messungen am Coulter Counter

2.1 Zur Strom- und Spannungsmessung an den Elektroden wurde ein DIGITAVO HY 510b-Meßgerät der Fa. Philips verwendet.

2.2 Der Kapillarwiderstand wurde routinemäßig am Meßstandkabel bei angeschlossenem Vakuum gemessen mit einem SANWA-Vielfachmeßgerät Modell SH-63 TR.

2.3 Die Abhängigkeit der Diskriminatorspannung vom eingestellten Schwellwert (Abschn. 4.1.3) wurde mit Hilfe des Plotters ermittelt. Zur Abstimmung der Plotter-Skala auf die Diskriminator-Skala des Coulter Counters wird der Prüfschalter am Plotter in Stellung 3 gebracht. Dann kann zwischen der Prüf-Buchse am Plotter und dem Plotter-Chassis die Diskriminatorspannung des Coulter Counters in Abhängigkeit vom eingestellten Schwellwert gemessen werden.

2.4 Bestimmung der Impulsform und -dauer.

Die Impulse wurden an dem zum Verstärker führenden Steckerkabel im Vorverstärker abgegriffen und gegen Masse gemessen. Das zur Spreizung der Impulse angeschlossene Tektronix-Oszilloskop Type 545 ist ausgerüstet mit einer RVS-Polaroid-Land Kamera mit Oszilloskop-Adapter.

Bildmaterial: Polaroid-Land Typ 47 Speed 3 000.

3. Messung der Elektrolytleitfähigkeit

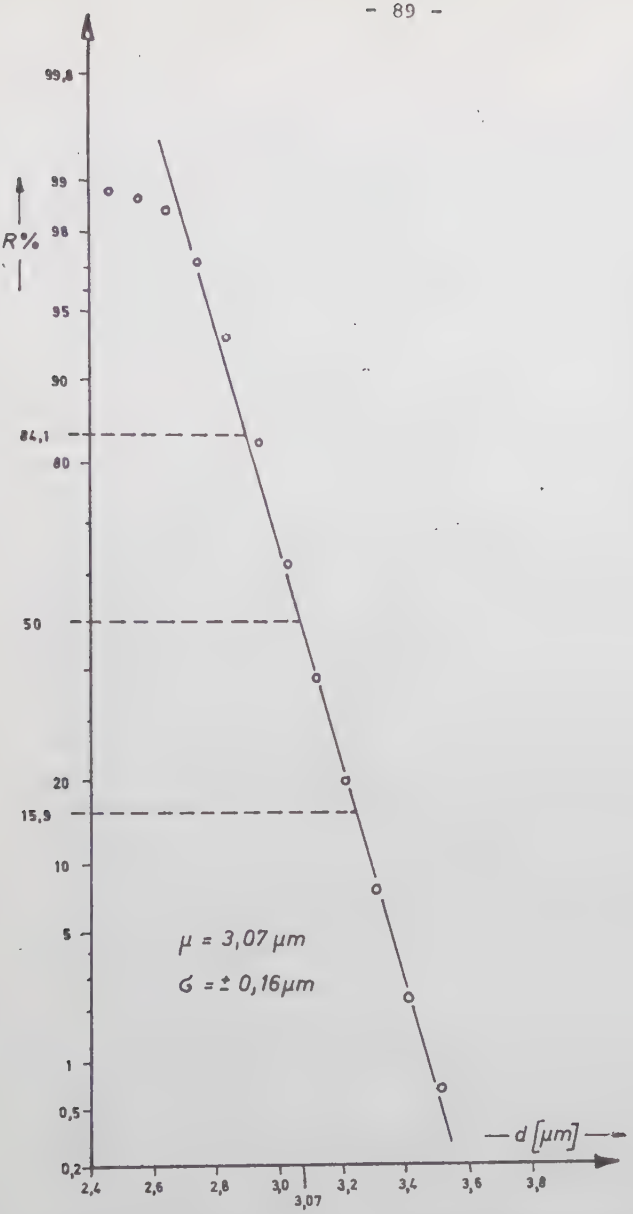
Die Bestimmung der Leitfähigkeit der verwendeten NaCl-Lösungen wurde mit einem WTW-Leitfähigkeitsmesser Type LBR bei 3ooo Hz vorgenommen. Temperatur: 2o°.
Die Zellenkonstante wurde mit o,o1m KCl-Lösung ermittelt.

4. Aufnahme des Strömungsverlaufes in den Kapillaren

Auf einer optischen Bank mit Bogenlampe wurde aus dem Kondensor und einer Objektivlinse eine Projektionsapparatur aufgebaut und auf einem Schirm das Bild der durchleuchteten Kapillare erzeugt.
Die zunächst leere Kapillare wurde 6 cm tief in ein mit Wasser gefülltes Becherglas getaucht. An der Kapillare war eine 5 ml-Plastik-Injektionsspritze so mit Gummiringen befestigt, daß die Spitze der Kanüle (Nr. 14) ca. 2 mm vor der Bohrung lag. Die Spritze wurde mit verdünnter Tusche (1:3o) gefüllt und die Tuschesuspension frei aus der Kanüle ausfließen gelassen. Durch die Druckdifferenz zwischen Innen- und Außenseite der Kapillare wurde ein Wasserstrahl durch die Bohrung gedrückt und dabei die Tusche mit eingesaugt. Die Abb. 18 a-c zeigen die mit abnehmender Druckdifferenz bei der Füllung der Kapillare entstandenen Strömungsbilder.

5. Eichsubstanzen

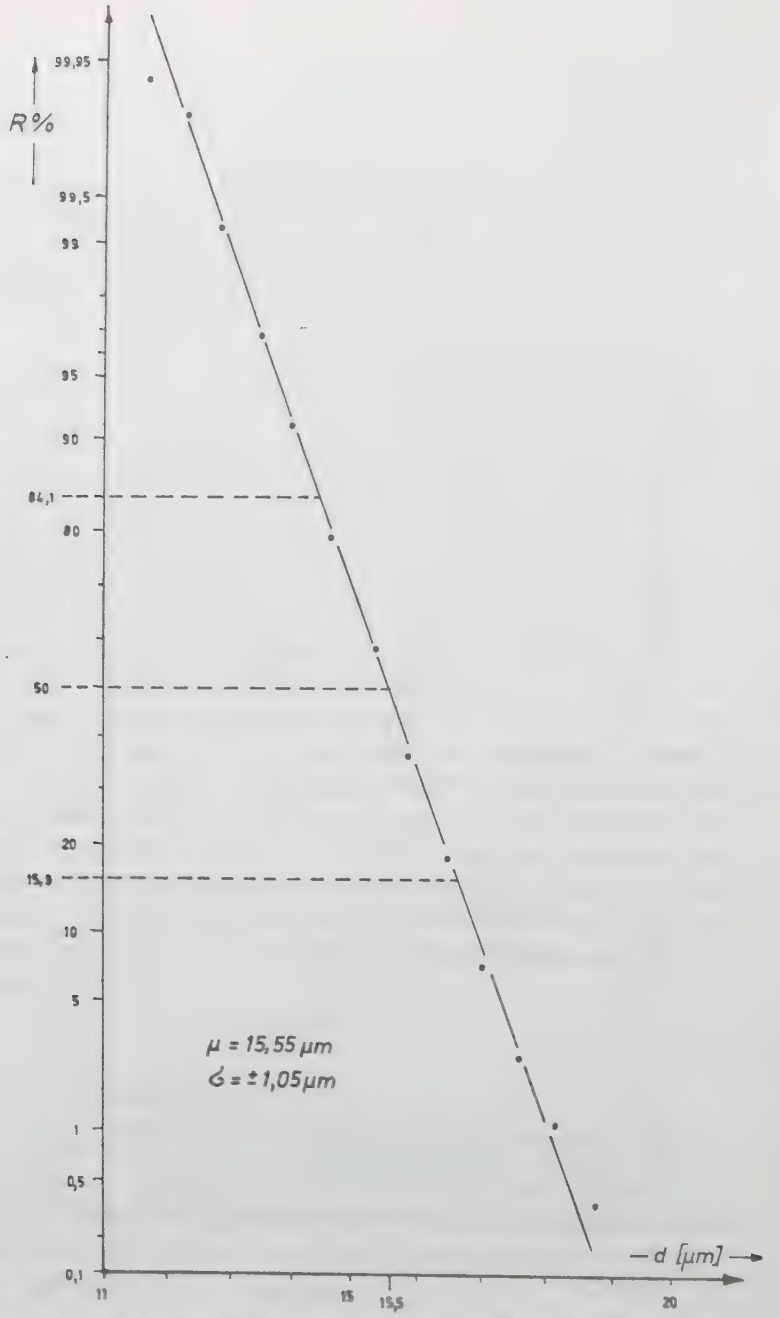
5.1 Pupp-Ball Sporen und Nettle Pollen wurden mit dem Gerät von Coulter Electronics Ltd. geliefert. Die Pupp-Ball Sporen enthalten Aggregate aus 2-4 Sporen, die sich nicht dispergieren lassen. Dies setzt den Wert der Sporen als Eichsubstanz herab.



Anzahl-Rückstandssummenverteilung von Pupp-Ball-Sporen 3,1μm.

TGZ 3

Abb. 24



Anzahl-Rückstandssummenverteilung von Nettle-Pollen 15,5 μm

Abb. 25 TGZ 3

Lycopodium Sporen sind in Apotheken erhältlich.

Die Teilchendurchmesser dieser drei Substanzen sind normalverteilt. Die Verteilungsparameter sind in den Abb. 24,25 und 26 eingetragen.

5.2 Die Latex-Partikel werden von der Firma DOW hergestellt. Der Vertrieb erfolgt durch:

SERVA-Entwicklungslabor
Heidelberg.

Kat. Nr. 41 960 Styrol-DVB-Polymer 7,6 µm Durchmesser
41 965 " 25,7 µm Durchmesser

Die mikroskopische Ausmessung der Teilchen mit Hilfe des Teilchengrößenanalysators TGZ 3 zeigte, daß die Verteilungsbreite der Latices größer ist als die der verwendeten Pollen und Sporen. Auf den Latex-Packungen ist zwar ein Durchmesserwert angegeben, jedoch kein Wert für die Standardabweichung. Dies kann den falschen Eindruck entstehen lassen, daß es sich um monodisperse Teilchen handelt. Bei der Ausmessung des mit "25,7 µm" bezeichneten Latex' wurde der häufigste Durchmesser zu 29,3 µm bestimmt. Die Durchmesserangabe "7,6 µm" für die zweite Latex-Probe konnte bestätigt werden.

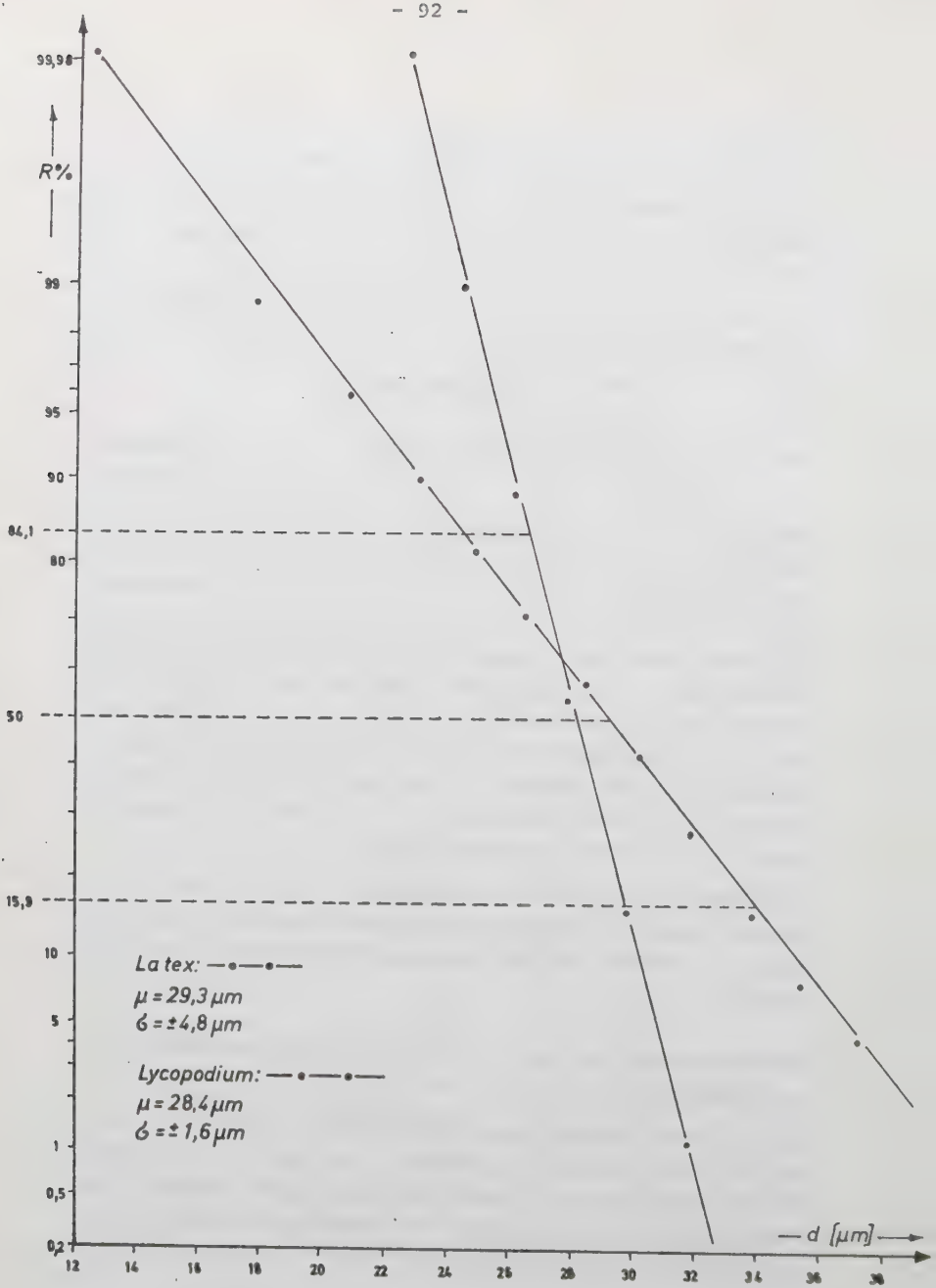
Die Latex-Partikel 7,6 µm weisen für den Teilchendurchmesser eine log. Normalverteilung auf; Latex 29,3 µm hat normalverteilten Teilchendurchmesser (siehe Abb. 27 und 26).

5.3 Die Quarzsand-Fraktion von 20-30 µm Korngröße wurde folgendermaßen gewonnen:

Gereinigter Seesand (Merck Kat. Nr. 7711) wurde 4 h in einer Achat-Kugelmühle gemahlen. Der Anteil <37 µm wurde durch Naßsiebung mit Wasser vom Siebgroben getrennt. Zur Fraktionierung des Siebfeinen dienten micro-mesh-Siebe mit 20 und 30 µm Maschenweite [+)].

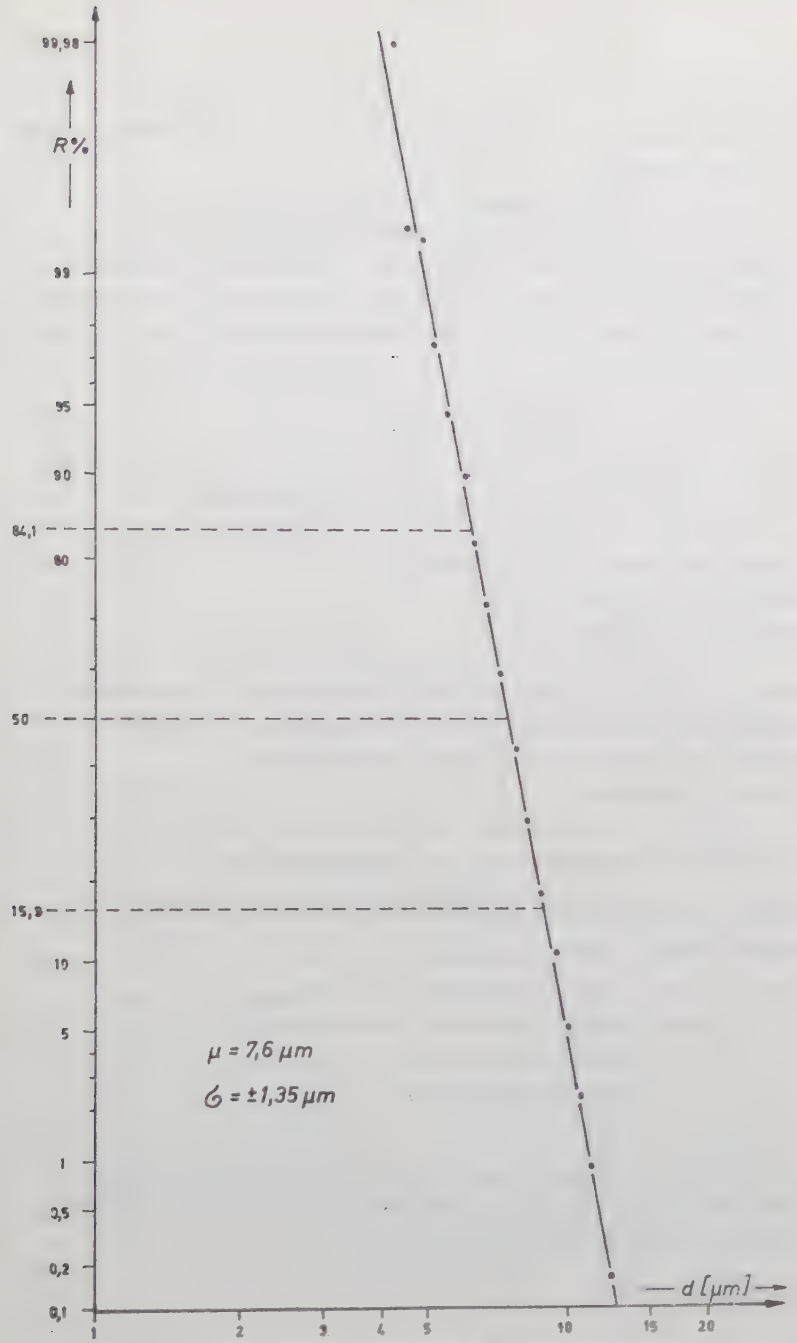
---

x) Für die Überlassung von Mustern dieser Siebe danke ich der Firma BUCKBEE MEARS COMPANY St.Paul Minn. USA herzlich.



Anzahl-Rückstandssummenkurven von Latex-Partikeln 29,3 μm und Lycopodium-Sporen TGZ 3

Abb. 26



Anzahl-Rückstandssummenkurve von Latex-Partikeln 7,6 μm

Abb. 27 TGZ 3

5.4 Formaldehyd-Kasein wird unter dem Handelsnamen "ESMA-SPRENG" von der Firma

Edelfettwerke W. Schlüter
Hamburg- Eidelstedt

in den Handel gebracht. Es ist ein unlösliches, nichtquellendes Tablettensprengmittel. Die verwendete Teilchengrössenfraktion von 2o-3o µm wurde ebenfalls durch Naßsiebung gewonnen.

6. Ausrüstung zur mikroskopischen Teilchengrößenbestimmung

6.1 Leitz-Laboratoriumsmikroskop SM
Objektive: 1o/o,25 und 63/o,85
Okular: Huygens 1ox
Niedervoltleuchte 6 V 2,5 A ohne Farbfilter
Mikro-Ansatz zur LEICA mit Belichtungsmesser MICROSIX-L
Meßstelle im Meßstutzen des Mikro-Ansatzes zur LEICA
LEICA IIIc ohne Objektiv, mit Drahtauslöser
Kleinbildfilm KB 17.

6.2 Vergrößerung der Negative auf Format DIN A 4

Papier: AGFA-GEVAERT Copyline Projection P 9o

Resultierende Gesamtvergrößerung:

Pupp-Ball Sporen	$1{,}96 \times 1o^3$
Latex 7,6 µm	$1{,}43 \times 1o^3$
Nettle Pollen	$3{,}15 \times 1o^2$
Lycopodium Sporen	$2{,}86 \times 1o^2$
Latex 29,3 µm	$3{,}12 \times 1o^2$

Zur Ermittlung der Gesamtvergrößerung wurde eine Mikrometerskala photographiert und bei der jeweiligen Vergrösserung in das Teilchenbild einkopiert.

6.3 Ausmessung und Zählung der photographierten Teilchen.

Teilchengrößenanalysator TGZ 3 nach ENDTER
der Firma Carl Zeiss Oberkochen/Württ.

Zählart: Summenverteilung, mit linearer Schrittbreite und normalem Meßbereich.

Ausgezählte Teilchen:

Pupp-Ball Sporen	1 8oo
Latex 7,6 µm	1 2oo
Nettle Pollen	3 15o
Lycopodium Sporen	1 ooo
Latex 29,3 µm	1 ooo.

7. Bereitung der Teilchensuspension zur Messung mit dem Coulter Counter

7.1 Herstellung der Elektrolytlösung

Außer bei der Bestimmung der Abhängigkeit des Eichfaktors von der Elektrolytleitfähigkeit wurde stets mit einer 1 %igen (g/ml) NaCl-Lösung gearbeitet.
Nach Lösen des Kochsalzes in demineralisiertem Wasser wurde die Lösung mit einer Schlauchpumpe durch ein Millipore-Filter gepumpt. Dadurch konnten die durch Teilchenverunreinigungen des Elektrolyten bedingten Zählwerte bei leerem Elektrolyten sehr niedrig gehalten werden.

Pumpe: WATSON-MARLOW H.R. Flow Inducer Typ MHRE

Mit Tygon-Schlauch von 3 mm Innendurchmesser wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 2oo ml/min erreicht.

Filter: Millipore Filterhalter Kat. Nr. XX 3o o25 oo
Vorfilter AP 25 o22 oo
Filter (o,8 µm) AAWP o 25 oo

7.2 Dispergierung der zu messenden Teilchen.

Zur Benetzung der Pupp-Ball Sporen und des Nettle Pollens wurde die Elektrolytlösung auf eine Konzentration von o,ol % Natriumlaurylsulfat gebracht.
Für Lycopodium Sporen sind o,o5 % Natriumlaurylsulfat nötig.
Die Dispergierung erfolgte mit einem Vibro-Mixer E 1 der Firma AG für Chemie-Apparatebau Zürich.
Dieser Mixer besitzt einen Wechselstrom-Schwinganker, der eine Schwingung von loo Hz mit regelbarer Amplitude erzeugt. Bei Verwendung des Peitschenrührers entsteht in der Suspension eine starke turbulente Strömung, die sehr schnelles Dispergieren der Teilchen ermöglicht.

Quarz, Formaldehyd-Kasein und Latex konnten ohne Netzerzusatz dispergiert werden.

Um grobe Verunreinigungen in den Suspensionen zu entfernen, wurden diese nach der Dispergierung durch ein 48 µm-Sieb gegossen (bei Latex 29,3 µm und Lycopodium) bzw. durch ein 3o µm-Sieb (bei Pupp-Ball Sporen , Latex 7,6 µm und Nettle Pollen).

8. Hinweise zur Arbeit mit dem Coulter Counter

8.1 Die Zählraten einer Versuchsreihe wurden durch Subtraktion des anschließend bei den gleichen Einstellungen bestimmten Elektrolytleerwertes korrigiert. Bei jeder Schwellwert-Einstellung wurden mindestens zwei Zählungen durchgeführt, meistens jedoch vier Zählungen.

8.2 Um die Fehlzählung durch Störimpulse aus dem Lichtnetz oder der Umgebung des Coulter Counters niedrig zu halten, wurde bei möglichst geringer Verstärkung gemessen, indem die von der gewählten Matching-Switch-

Einstellung abhängige maximale Stromstärke eingestellt wurde. Zusätzlich empfiehlt sich der Einbau des Meßstandes in einen Faradayschen Käfig.

Bei hohen Verstärkungen können Störimpulse registriert werden, die durch an Kunstfaser-Kleidungsstücken des Messenden auftretende Reibungselektrizität erzeugt werden. Sehr starke Störungsquellen sind Thyristor-Schaltungen, wie sie zur Temperatur-Programmierung bei Gaschromatographen und auch in Thermostaten verwendet werden. Die Störimpulse können über weite Strecken im Lichtnetz verfolgt werden und lassen sich auch durch Entstörglieder nicht ausreichend eliminieren.

8.3 Die besonders bei englumigen Kapillaren häufig auftretenden und sehr lästigen Verstopfungen der Bohrung durch Teilchenverunreinigungen und Staub lassen sich leicht entfernen, wenn man den Hahn der Speiseleitung am Meßstand kurz öffnet. Durch den einströmenden Elektrolyten entsteht im Inneren der Kapillare ein geringer Überdruck, der die Verunreinigungen aus der Bohrung drückt.
Das Becherglas im Meßstand wird zweckmäßig durch eine Klarsichtplastikfolie von ca. 0,5 mm Dicke abgedeckt, die als Staubschutz dient.

8.4 Der zur Messung nötige Unterdruck von 200 mm Hg wird durch ein Reduzierventil am Meßstand konstant gehalten. Es kommt öfter vor, daß trotz dieses Ventils ein zu großer Unterdruck entsteht. Beim Öffnen des Vakuumhahnes tritt dann das Quecksilber aus dem einen Manometerschenkel aus und fließt in die Kapillare. Ist dies geschehen, muß das Manometer ausgebaut und neu mit dem gereinigten und getrockneten Quecksilber gefüllt werden. Um diese Prozedur zu vermeiden, wurde in die Vakuumleitung ein Kontrollmanometer eingesetzt, das es gestattet, jederzeit den anliegenden Unterdruck zu prüfen. Man kommt auch ohne ein zweites Manometer aus, wenn man zu Beginn der Meßreihe den Vakuumhahn vorsichtig öffnet und die Bewegung der Quecksilbersäule beobachtet.

D. ANHANG

ÜBERSICHT DER BISHERIGEN VERWENDUNG DES COULTER COUNTERS IN DER PHARMAZEUTISCHEN TECHNOLOGIE

In der pharmazeutischen Technologie ergeben sich zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für den Coulter Counter.

Sehr gut geeignet ist das Gerät zur Bestimmung von Partikelverunreinigungen in Injektions- und Infusionslösungen, da es sich hierbei überwiegend um Elektrolytlösungen handelt, die direkt gemessen werden können. Über solche Kontrollen berichten AMACHER |1|, GROVES |18,19|, MADSEN |36| und VESSEY |53|. Um eine Sekundärkontamination der Lösungen beim Umfüllen zu vermeiden, benutzt LINES |35| eine Kapillare, die in die geöffneten Ampullen oder Infusionsflaschen eingeführt werden kann.

Auch für die Untersuchung von Instabilitätserscheinungen bei Suspensionen eignet sich der Coulter Counter gut, da die suspendierten Teilchen nicht aus dem Suspensionsmittel entfernt werden müssen, um gemessen werden zu können. Die Empfindlichkeit des Gerätes ermöglicht z.B. die Bestimmung des Partikelwachstums in Suspensionen schwerlöslicher Substanzen. Darüber hat W.I.HIGUCHI für Methylprednisolon |26| und für Cholesterin |29| berichtet, bzw. CARLESS |8| für Cortisonazetat.

Flockungserscheinungen in Latex-Modellsuspensionen wurden ebenfalls von W.I.HIGUCHI |3o| und MATTHEWS |39| mit Hilfe des Coulter Counters untersucht.

Die Bestimmung des Dispersitätsgrades von O/W-Emulsionen ist ein weiteres wichtiges Verwendungsgebiet für das Gerät. Hier ist auf einen Übersichtsartikel von GROVES |2o| und auf die Untersuchungen von RAHM |44,45| über das HLB-System an pharmazeutischen Emulsionen hinzuweisen.

Probleme der Lösungskinetik werden ebenfalls mit Hilfe des Coulter Counters bearbeitet. So haben W.I.HIGUCHI |28| und EDMUNDSON |13| die Lösungsgeschwindigkeit von Dibutylphthalattropfen bzw. Prednisolon aus der Abnahme der Teilchendurchmesser bestimmt. Die umfangreichen theoretischen Ableitungen von W.I.HIGUCHI |27| für die Lösungsgeschwindigkeit von mikronisiertem Methylprednisolon als Funktion der abnehmenden Substanzoberfläche wurden an einer mit dem Coulter Counter bestimmten Teilchengrößenverteilung der Substanz experimentell nachgeprüft.

Über eine Untersuchung der Veränderung einer Teilchengrößenverteilung von Acetylsalicylsäure beim Tablettieren hat VAN OOTEGHEM |52| berichtet.

Da Forderungen der Mikronisierung von Arzneistoffen zur Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit immer zahlreicher werden, wird man den Coulter Counter wegen seiner Schnelligkeit der Messung auch für routinemäßige Kontrollen an Stelle anderer Analysenmethoden einsetzen. Beispiele bieten FUCHS |16|, MATTHEWS |38|, REETZ |46|, SHORT |48| und THORNTON |51|.

E. ALPHABETISCHES LITERATUR-VERZEICHNIS

1	AMACHER, P., BOYMOND, P.	Pharm.Acta Helv. 42, 357 (1967)
2	BATCH, B.A.	J.Inst.Fuel 37, 455 (1964)
3	BERG, R.H.	ASTM Special Publication Nr. 234 Philadelphia 1968
4	BERNHARDT, C., SCHICKEL, A.	Bergakademie 12, 752 (1966)
5	BRECHER, G. et al.	Amer.J.clin.Pathol. 26, 1439 (1956)
6	BRECHER, G. et al.	Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 242 (1962)
7	BUNGAY, H.R., KREBS, R.D.	J.Sci.Instr. 42, 891 (1965)
8	CARLESS, J.E. et al.	J.Pharmacy Pharmacol. 20, 630 (1968)
9	COOPER, W.D., PARFITT, G.D.	Kolloid-Z., Z.Polymere 223, 160 (1968)
10	COULTER ELECTRONICS LTD.	Instruction Manual for Coulter Counter Model B
11	COULTER ELECTRONICS LTD.	Industrial Bibliography Oct. 1968
		Medical and Biological Bibliography Jan. 1968
		Supplement No. 1 Jan. 1969
12	ECKHOFF, R.K.	J.Sci.Instr. 44, 648 (1967)
13	EDMUNDSON, I.C., LEES,K.A.	J.Pharmacy Pharmacol. 17, 193 (1965)
14	EDMUNDSON, I.C.	Nature 212, 1450 (1966)
15	EDMUNDSON, I.C.	Advances in Pharmaceutical Sciences Vol. 2 p. 162
		Academic Press London-New York 1967
16	FUCHS, P., RIEMANN, J.et al	Arzneimittel-Forsch. 18, 112 (1967)
17	GREGG, E.C., STEIDLEY, K.D.	Biophysical J. 5, 393 (1965)
18	GROVES, M.J., MAJOR, F.G.	Pharmac. J. 193, 227 (1964)
19	GROVES, M.J.	J.Pharmacy Pharmacol. 18, 161 (1966)
20)	GROVES, M.J., FRESHWATER, D.C.	J.Pharm.Sci. 57, 1273 (1968)

21	HACKENBERG, P.	Tonind.Ztg. 92, 482 (1968)
22	HARRIS, C.C., JOWETT, A.	Nature 208, 175 (1965)
23	HARRIS, C.C., JOWETT, A.	Nature 212, 1450 (1966)
24	HARVEY, R.J., MARR, A.G.	J.Bacteriology 92, 805 (1966)
25	HEIDENREICH, E.	Wiss.Z.Techn.Univ.Dresden 14, 1255 (1965)
26	HIGUCHI, W.I., LAU, P.K.	J.Pharm.Sci. 51, 1081 (1962)
27	HIGUCHI, W.I., ROWE, E.L., HIESTAND, E.N.	J.Pharm.Sci. 52, 162 (1963)
28	HIGUCHI, W.I.	J.Pharm.Sci. 53, 405 (1964)
29	HIGUCHI, W.I., SAAD, H.Y.	J.Pharm.Sci. 54, 74 (1965)
30	HIGUCHI, W.I., RHEE, T.O., FLANAGAN, D.R.	J.Pharm.Sci. 54, 510 (1965)
31	KUBITSCHEK, H.E.	Nature 182, 234 (1958)
32	KUBITSCHEK, H.E.	Research (London) 13, 128 (1960)
33	KUBITSCHEK, H.E.	Rev.Sci.Instr. 33, 576 (1962)
34	KUBITSCHEK, H.E.	Rev.Sci.Instr. 35, 1598 (1964)
35	LINES, R.W.	J.Pharmacy Pharmacol. 19, 701 (1967)
36	MADSEN, T.	Arch.Pharm.Chemi 75, 3 (1968)
37	MATTERN, C.F.T. et al.	J.Appl.Physiol. 10, 56 (1957)
38	MATTHEWS, B.A., RHODES,C.T.	J.Pharm.Sci. 56, 838 (1967)
39	MATTHEWS, B.A., RHODES,C.T.	J.Pharm.Sci. 57, 557,569 (1968)
40	MERCER, W.B.	Rev.Sci.Instr. 37, 1515 (1966)
41	NIEDIEK, E.A.	Dissertation Karlsruhe 1968
42	PRINCEN, L.H., KWOLEK,W.F.	Rev.Sci.Instr. 36, 646 (1965)
43	PRINCEN, L.H.	Rev.Sci.Instr. 37, 1416 (1966)
44	RAHM, H.	Dissertation ETH Zürich 1966
45	RAHM, H., SOLIVA, M., SPEISER, P.	Pharm.Acta Helv. 44, 1 und 356 (1969)

46	REETZ, W., SPEISER, P.	Pharm.Acta Helv. 44, 65 und 238 (1969)
47	SAMYN, J.C., McGEE, J.P.	J.Pharm.Sci. 54, 1794 (1965)
48	SHORT, P.M., LINCOLN, S.V., RHODES, C.T.	Pharmazie, 24, 319 (1969)
49	SHOTTON, E., DAVIS, S.S.	J.Pharmacy Pharmacol. 20, 430 (1968)
50	SPIELMAN, L., GOREN, S.L.	J.Coll.Interface Sci. 26, 175 (1968)
51	THORNTON, M.I.	J.Pharm.Pharmacol. 15, 742 (1963)
52	VAN OOTEGHEM, M., BONI, R., HERBOTS, H.	Cesk.Farm. 18, 122 (1969) ref.: Ph.Ztg. 114, 992 (1969)
53	VESSEY, I., KENDALL, C.E.	Analyst, 91, 273 (1966)
54	VOGELSANG, E.	Einführung in die Elektronik Verlag Karl Thiemig München 1968
55	WACHTEL, R., LA MER, V.K.	J.Colloid Sci. 17, 531 (1962)
56	WALES, M., WILSON, J.N.	Rev.Sci.Instr. 32, 1132 (1961)
57	WALES, M., WILSON, J.N.	Rev.Sci.Instr. 33, 575 (1962)
58	WALSTRA, P., OORTWIN, H.	J.Coll.Interface Sci. 29, 424 (1969)

L E B E N S L A U F

Am 26. April 1939 wurde ich, Gerhard Raisig, als Sohn des Diplom-Ingenieurs Karl Raisig und seiner Ehefrau Ellen, geb. Schumann, in Nürnberg geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Edenkoben/Pfalz trat ich 195o in das Progymnasium Edenkoben ein. 1952 wechselte ich auf das Staatliche Naturwissenschaftliche Gymnasium Landau/Pf. über, an dem ich im Februar 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Meine praktische pharmazeutische Ausbildung erhielt ich in der Adler-Apotheke Landau/Pfalz. Nach Bestehen der Pharmazeutischen Vorprüfung im März 1962 in Neustadt/Wstr. begann ich im WS 62/63 an der Universität Würzburg das Studium der Pharmazie, das ich im Oktober 1965 mit der Pharmazeutischen Prüfung beendete.

Anschließend war ich dreieinhalb Monate als Kandidat der Pharmazie in der Mohren-Apotheke Karlstadt/Main beschäftigt.

Die vorliegende Arbeit habe ich im April 1966 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, Vorstand Professor Dr. C.H. Brieskorn, begonnen. Sie stand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. J. Riehl.

Ich habe mich bei keiner anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren G. Briegleb, C.H. Brieskorn, H. Hahn, D. Henschler, S. Hünig, H. Kulenkampff, J. Riehl, T. Schoon, W. Simonis, W. Strohmeier, P. Tunmann und O.H. Volk.

VERVIELFÄLTIGUNG

E. Schmitt u. M. Meyer
Würzburg
Alte Kasernstraße 7
Tel. 591374